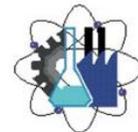




Instituto de Biotecnología  
UNAM



Facultad de Ciencias  
Químicas e Ingeniería

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS  
INGENIERÍA QUÍMICA

Instituto de Biotecnología  
Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis

**Evaluación de la velocidad de transferencia de oxígeno y concentración del ácido valérico en matraces agitados sobre la composición monomérica del copolímero P(3HB-co-3HV) producido por la cepa modificada de *Azotobacter vinelandii* OPNA**

TESIS

Que para obtener el título de  
INGENIERO QUIMICO

PRESENTA:

CRUZ NORIEGA PAOLA IVETH

DIRECTOR DE TESIS

DR. CARLOS FELIPE PEÑA MALACARA, IBT UNAM.

CUERNAVACA, MORELOS A 03 DE OCTUBRE DEL 2022.

## DEDICATORIA

*El punto de partida de todo logro es el deseo.*

Napoleon Hill

A mis padres, Rodolfo Cruz Lezo y Emma D. Noriega Aguirre, a quienes les debo todo lo que soy. Gracias por su apoyo y amor incondicional, gracias por su esfuerzo y confianza en mí; Gracias por hacer de mí una buena persona y encaminarme a crecer profesionalmente.

Con todo mi amor, esto es para y por ustedes.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al Dr. Carlos Peña por su apoyo y tiempo para realizar este trabajo, por los conocimientos que compartió conmigo y por darme la confianza de formar parte de su equipo de trabajo.

Agradezco también a la Dra. Celia quien siempre estuvo pendiente de mí y me ayudo en mi trabajo dentro del laboratorio. Le agradezco su paciencia y sus consejos.

A los miembros del comité revisor, Dr. Carlos Peña, Dr. Andrés García, Dr. Roberto Flores, Mtro. Daniel Morales y Dr. Horacio Martínez, por sus observaciones y sugerencias que ayudaron a enriquecer el proyecto.

# ÍNDICE GENERAL

## Tabla de contenido

INDICE DE FIGURAS .....	6
INDICE DE TABLAS .....	7
RESUMEN .....	8
1. INTRODUCCIÓN:...	9
2. ANTECEDENTES.....	10
2.1 Generalidades de los Polihidroxicanoatos .....	10
2.2 Estructura y propiedades.....	11
2.3 Clasificación de los PHAs .....	12
2.4 Aplicaciones de los polihidroxicanoatos.....	13
2.5 <i>Azotobacter vinelandii</i> .....	16
2.5.1 <i>Azotobacter vinelandii</i> cepa OPNA .....	16
2.6 Efecto de las condiciones de cultivo sobre la copolimerización.....	18
3. JUSTIFICACIÓN.....	22
4. HIPÓTESIS .....	22
5. OBJETIVOS.....	22
5.1 General .....	22
5.2 Específicos .....	23
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	23
7.1 Cepa .....	25
7.1.1 Preservación de la cepa .....	25
7.1.2 Medio de cultivo.....	25
7.2 DESARROLLO DE CULTIVOS. ....	27
7.2.1 Pre-inóculo .....	27
7.2.2 Preparación del inóculo para los cultivos en matraz de 250 mL.....	27
7.2.3 Estimación de la $VTO_{máx}$ en los cultivos. ....	27
8. DETERMINACIONES ANALÍTICAS .....	28

8.1	Determinación de biomasa por peso seco .....	28
8.2	Determinación de proteína de la biomasa celular .....	28
8.3	Cuantificación de sacarosa.....	30
8.4	Cuantificación e identificación de PHAs por cromatografía de gases (GC) con detector de ionización de flama (FID) .....	32
8.4.1	Derivatización de PHAs. ....	33
8.5	Crecimiento microbiano y ecuación logística .....	33
9.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	34
9.1	Valores de pH en función de la concentración de MOPS .....	34
9.2	Influencia de la concentración de ácido valérico sobre el crecimiento medido como proteína en distintas condiciones de <i>VTO</i> <sub>máx</sub> . ....	35
9.3	Influencia de la concentración de ácido valérico sobre el crecimiento de biomasa en distintas condiciones de VTO máx. ....	40
9.4	Consumo de sacarosa en función de la concentración de precursor a diferentes <i>VTO</i> <sub>máx</sub> . ....	43
9.5	Efecto de la concentración de ácido valérico sobre la acumulación de PHAs, a diferentes velocidades de transferencia de oxígeno.....	47
9.6	Composición del copolímero en función de la concentración del precursor bajo diferentes VTOs. ....	50
10.	CONCLUSIONES .....	53
11.	PERSPECTIVAS .....	54
12.	REFERENCIAS .....	55

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Estructura química de un polihidroxicanoato.....	10
Figura 2	Clasificación de los polihidroxicanoatos.....	12
Figura 3	Fotografía de <i>Azotobacter vinelandii</i> OPNA vista con objetivo de 40x.....	17
Figura 4	Estrategia experimental.....	24
Figura 4.1	Metodología para los cultivos y determinaciones analíticas realizadas... 24	
Figura 5	Curva estándar de proteína para la cuantificación de proteína total. ....	29
Figura 6	Curva patrón de sacarosa para la cuantificación de sacarosa por el método $\beta$ - fructofuranosidasa-DNS.....	31
Figura 7	Efecto de la concentración del ácido valérico sobre el crecimiento de proteína a una VTOM <sub>áx</sub> de 5.8 mmol/ L h (a); a una VTOM <sub>áx</sub> de 12 mmol/ L h (b) y a una VTOM <sub>áx</sub> de 21 mmol/ L h (c). ....	37
Figura 8	Efecto de la concentración del ácido valérico sobre el crecimiento de biomasa a una VTOM <sub>áx</sub> de 5.8 mmol/ L h (a); a una VTOM <sub>áx</sub> de 12 mmol/ L h (b) y a una VTOM <sub>áx</sub> de 21 mmol/ L h (c). ....	42
Figura 9	Efecto de la concentración del ácido valérico sobre el consumo de sacarosa a una VTOM <sub>áx</sub> de 5.8 mmol/ L h (a); a una VTOM <sub>áx</sub> de 12 mmol/ L h (b) y a una VTOM <sub>áx</sub> de 21 mmol/ L h (c). ....	44
Figura 10	Efecto de la concentración de ácido valérico sobre la acumulación de PHB con una VTO de 5.8 mmol/ L h (a), 12 mmol/ L h (b) y 21 mmol/ L h (c). ....	49
Figura 11	Porcentaje de HV en el copolímero PHBV a diferentes VTOs, utilizando concentraciones de ácido valérico de a) 20 mM, b) 30 mM y c) 40 mM.....	52

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Aplicaciones del P (3HB-co-3HV). .....	15
Tabla 2.	Resumen de la producción de PHBV por <i>A. vinelandii</i> OP en biorreactor a diferentes tasas de agitación reportada por Urtuvia <i>et al.</i> (2020). .....	19
Tabla 3.	Composición del medio Burk-Sacarosa líquido. ....	26
Tabla 4.	Cambios en el pH en función de la concentración de MOPS en el medio. ....	35
Tabla 5.	pH final de cultivos con concentraciones de precursor de 20, 30 y 40 mM, empleando MOPS con una concentración de 150 mM. ....	35
Tabla 6.	Velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación en función de la concentración de ácido valérico a una VTOMáx de 5.8 mmol/ L h. ....	38
Tabla 7.	Velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación en función de la concentración de ácido valérico a una VTOMáx de 12 mmol/ L h. ....	38
Tabla 8.	Velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación en función de la concentración de ácido valérico a una VTOMáx de 21 mmol/ L h. ....	39
Tabla 9.	Tabla comparativa de los rendimientos de biomasa y velocidades de consumo con diferente concentración de precursor bajo distintas VTOs máximas. ....	46
Tabla 10.	Acumulación del copolímero PHBV y porcentaje de HV en el copolímero bajo diferentes velocidades de transferencia de oxígeno. ....	51

## RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar diferentes velocidades de transferencia de oxígeno ( $VTO$ ), así como distintas concentraciones de ácido valérico empleado como precursor, para producir el copolímero P (3HB – co – 3HV) utilizando la cepa mutante de *Azotobacter vinelandii*, OPNA. Este copolímero tiene aplicaciones de interés industrial y biomédico, por su biodegradabilidad y biocompatibilidad. Esta cepa se caracteriza por ser sobre productora de P3HB. En la primera etapa de este proyecto se definió la concentración de MOPS que se utilizaría, con el fin de mitigar la caída del pH a causa del precursor. En la segunda etapa, se evaluó el crecimiento celular en cultivos de 72 horas en matraces agitados de 250 mL, lográndose obtener altos valores de biomasa hasta de 10.95 g/L, bajo una condición de  $VTO_{máx}$  de 5.8 mmol/L h y utilizando una concentración de precursor de 20 mM. En esta etapa, se demostró el efecto que tiene la velocidad de transferencia de oxígeno sobre la velocidad de crecimiento, la velocidad de consumo del sustrato, la acumulación y la copolimerización de los PHAs producidos; Cuando se incrementó la  $VTO_{máx}$  de 5.8 mmol/ L h a 21 mmol/L h, la acumulación promedio del copolímero P (3HB-co-3HV) disminuyó de 80 % (7.8 g/L) a 60 % (3.5 g/L). Sin embargo, se alcanzaron valores de 44.28 % de 3HV en la composición del copolímero, bajo la condición de  $VTO_{máx}$  más alta. Por otro lado, se observó que la concentración del precursor no influyó de manera significativa sobre el crecimiento y acumulación del copolímero.

## 1. INTRODUCCIÓN:

Dada la reciente atención prestada al calentamiento global, las industrias modernas se han preocupado cada vez más por el uso de procesos y métodos industriales amigables con el medio ambiente.

La cantidad de montañas de basura situadas tanto en la tierra como en los océanos incrementa potencialmente. Siendo la contaminación por plásticos una de las problemáticas más evidentes, que aumenta día con día y cada vez resulta más alarmante para la sociedad. Debido a esto es que se ha intentado atacar dicha problemática de la acumulación por plásticos a través de procesos de incineración, reciclaje, fotodegradación o reuso; sin embargo, estas medidas presentan desventajas, por lo que no se consideran como soluciones 100 % efectivas.

Por otro lado, la degradación de los plásticos sintéticos es muy lenta. Por ejemplo, la descomposición de productos orgánicos tarda 3 ó 4 semanas, la de telas de algodón 5 meses, mientras que, la del plástico puede tardar 500 años. Además, en buena medida la “degradación” de estos plásticos simplemente genera partículas de plástico más pequeñas que, a pesar de ya no ser evidentes, se acumulan en los ecosistemas (Segura, 2007).

Por lo anterior, es que en la actualidad existe un gran interés por la producción de plásticos biodegradables y en su aplicación para reemplazar los polímeros a base de petróleo, como son el polipropileno y polietileno, en ciertas aplicaciones. Lo anterior permitiría disminuir el impacto ambiental, reducir su persistencia en el medio ambiente y utilizar recursos renovables.

Dentro de los bioplásticos producidos por fermentación, se encuentran los polihidroxialcanoatos (PHAs), estos polímeros tienen características físicas similares a los plásticos derivados del petróleo tales como la densidad, fuerza de tensión, elongación y punto de fusión (Alzate, 2015), con la ventaja de que los PHAs se degradan completamente a  $CO_2$  y  $H_2O$  en condiciones aerobias o a  $CH_4$  en condiciones anaerobias (Delgado *et al.* 2015).

Dadas sus características tienen un gran potencial de uso en aplicaciones que van desde la manufactura de productos desechables de uso común, hasta la de productos biomédicos y farmacéuticos de alto valor agregado. Sin embargo, el precio de los PHAs es todavía alto en comparación con el de los plásticos derivados del petróleo (PET a granel, 3.5 a 5 pesos / kg, reportado por Recimex en 2017) por lo que se busca hacerlos más accesibles a la población, apostando por mejoras en el proceso de fermentación y extracción, así como aislar y desarrollar cepas microbianas más productivas y que puedan utilizar sustratos de bajo costo (García *et al.* 2013).

Es importante señalar que el costo de producir P3HB está influenciado por varios factores que incluyen costos de sustrato de fermentación, extracción de polímeros del citoplasma celular bacteriano, así como el manejo de los desechos de extracción y fermentación. Sin embargo, de todos los costos involucrados en la producción de P3HB, el costo de la fuente de carbono es el más alto (Vaishnav, 2021).

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 Generalidades de los Polihidroxicanoatos**

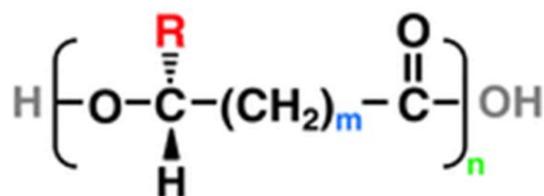
Los polihidroxicanoatos (PHAs), son polímeros de ácidos hidroxicanoicos que algunos microorganismos acumulan intracelularmente como material de reserva, cuando una fuente de carbono se encuentra disponible en exceso y si algún nutriente como nitrógeno, fósforo, hierro, magnesio, potasio u oxígeno está limitado, para usarlo posteriormente como fuente de carbono y energía (Delgado *et al.* 2015).

Los PHAs se acumulan en polímeros que son insolubles en agua, móviles y amorfos, tomando la forma de gránulos rodeados por una sola capa de fosfolípidos y que contienen enzimas polimerasas y depolimerasas (Rivera-Briso *et al.* 2018). En condiciones limitantes de sustrato, el PHA puede ser degradado por depolimerasas durante el metabolismo celular.

Además de su importancia en la fisiología celular de las bacterias, son biodegradables y pueden ser producidos a partir de fuentes renovables como azúcares y ácidos grasos por diferentes vías metabólicas (Patel *et al.* 2009).

## 2.2 Estructura y propiedades

Los PHAs presentan una estructura general, la cual se muestra en la Fig. 1. Donde R hace referencia a la longitud de la cadena lateral, m hace referencia al tamaño del grupo alquilo. Tanto R como m determinan el tipo de unidad monomérica de PHA (Loo & Sudesh, 2007).



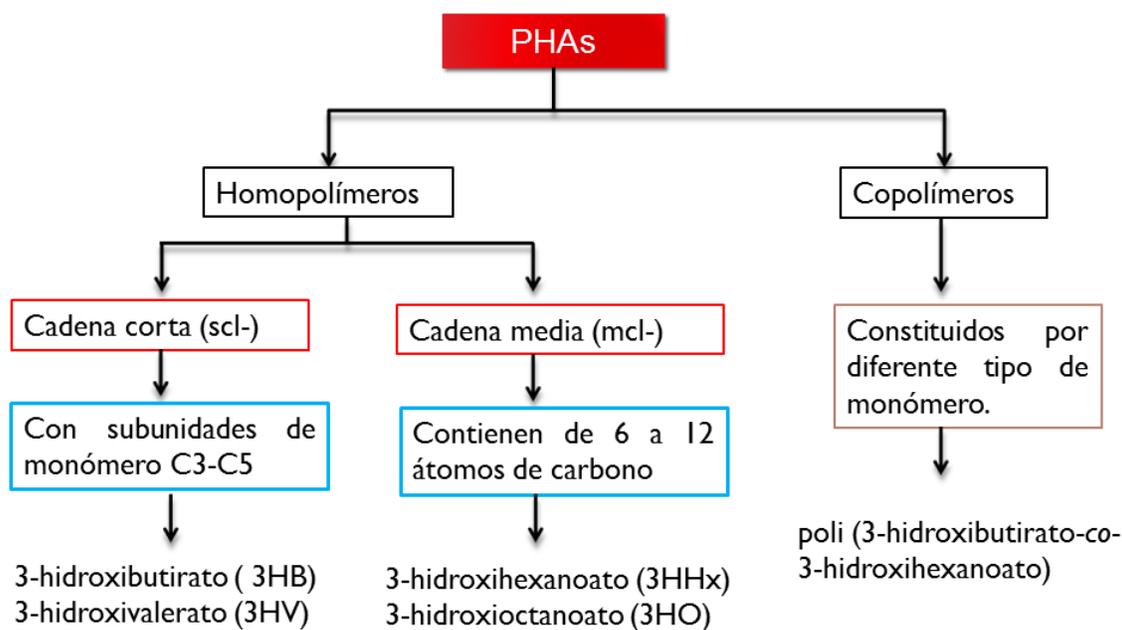
**Figura 1** Estructura química de un polihidroxicanoato.

Uno de los PHAs más comunes es el P3HB, el cual es un homopolímero cuyas unidades monoméricas están todas en la configuración D (-) debido a la estereoespecificidad de las enzimas involucradas en su biosíntesis. Este poliéster contiene un grupo metileno ( $-\text{CH}_2-$ ) como cadena lateral y un grupo alquilo ( $-\text{CH}_3$ ).

El P3HB es un polímero termoplástico con propiedades físicas similares a algunos polímeros derivados del petróleo, como el polipropileno (Rivera-Briso *et al.* 2018). Se ha encontrado que tiene una alta compatibilidad con el cuerpo humano por lo que ha recibido más atención en los últimos años. Sin embargo, es un polímero altamente cristalino (55 - 80 %), lo cual hace que sea un material excesivamente frágil. Además, su carácter rígido e hidrofóbico y su baja rapidez de degradación (en comparación con otros biomateriales) limitan su manipulación y función para ese tipo de aplicaciones. Por otro lado, su temperatura de transición vítrea y de fusión son 5 y 175 °C, respectivamente. (Barbosa *et al.* 2005).

## 2.3 Clasificación de los PHAs

Los PHAs se clasifican dependiendo la naturaleza de sus unidades monómeras, si el polímero está formado por un solo tipo de unidades se denomina homopolímero y si está formado por monómeros con distinta longitud de átomos de carbono se refiere entonces a un copolímero. Existen PHAs de cadena corta (scl, short-chain-length) con 3 - 5 átomos de carbono, como el poli-3-hidroxicaproato [P (3HV)] y el poli-3-hidroxiacetato [P (3HB)] y PHAs de cadena media (mcl, medium-chain-length) que se componen por monómeros de 6 a 14 átomos de carbono, como el poli-3-hidroxidecanoato [P (3HD)]. Esta clasificación se puede observar en la figura 2.



**Figura 2** Clasificación de los polihidroxicaproatos.

Las características principales de los PHAs de cadena corta son ser demasiado rígidos y frágiles; mientras que, los PHAs de cadena media son más elásticos pero dotados de menos fuerza mecánica. La adición de un pequeño porcentaje de subunidades de cadena lateral más largas en el P3HB provoca un aumento en la flexibilidad de este copolímero, haciéndolo útil como sustituto de los termoplásticos a granel (Page *et al.* 1992).

Se debe mencionar que la razón por la cual un PHA se forma como un polímero de cadena corta o media está relacionada directamente con la enzima encargada de la síntesis (sintasa) ya que esta es específica al sustrato y puede actuar sobre monómeros con diferente número de átomos de carbono (Anderson y Dawes, 1990); de esta manera la composición química de los PHAs va a depender del sustrato utilizado, de la enzima PHA-sintasa y de la ruta metabólica involucrada (Delgado *et al.* 2015).

## **2.4 Aplicaciones de los polihidroxicanoatos**

Como consecuencia de la contaminación por plásticos, se ha propuesto reemplazarlos con P3HB y otros biomateriales, por su naturaleza biodegradable. Sin embargo, el P3HB no cumple con las propiedades mecánicas requeridas para los procesos de fabricación, por lo que hasta ahora no ha sido viable su utilización.

Una estrategia ampliamente utilizada para mejorar las propiedades del P3HB es la incorporación de varios monómeros secundarios en la cadena polimérica para formar copolímeros. Por lo tanto, se pueden combinar más de 150 monómeros diferentes para desarrollar materiales con propiedades que varían drásticamente. (Rivera-Briso *et al.* 2018).

Los PHAs exhiben pesos moleculares relativamente altos, características termoplásticas o elastoméricas y otras propiedades físicas y mecánicas que los hacen candidatos para varias aplicaciones en la industria de empaques, medicina, farmacia, agricultura y alimentos, o como materias primas para la síntesis de químicos enantioméricamente puros y para la producción de pinturas (Babel y Steinbüchel, 2001).

Los PHAs resultan ser de gran interés tanto por sus propiedades como por sus aplicaciones, debido a ello en el grupo de Biopolímeros del Instituto de Biotecnología se ha estudiado la posibilidad de diseñar materiales compuestos en combinación para mejorar aún más las propiedades mecánicas. Poli (3-hidroxitirato), poli (3-hidroxitirato-co-3-hidroxiacetoato) y poli (3-hidroxitirato-co-3-hidroxihexanoato) son algunos de los polímeros que se han estudiado ampliamente.

El poli-3-hidroxibutirato (P3HB) es un material termoplástico biodegradable que se utiliza para producir plásticos para envases, películas de base biológica e implantes biocompatibles. Sin embargo, de todos los bioplásticos mencionados anteriormente, uno de los materiales más prometedores para aplicaciones biomédicas es el biopolímero poli (3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato), o PHBV, por su nula toxicidad, alta biocompatibilidad con muy diversos tipos de células y que hoy en día se puede producir a gran escala. Así mismo, posee excelentes propiedades, como su capacidad de absorción, origen biológico, piezoelectricidad y termoplasticidad, lo que lo hacen muy prometedor (Rivera-Briso *et al.* 2018).

La aplicación más conocida de los copolímeros, como el P (3HB-co-3HV), es para la fabricación de botellas desechables para champú, aunque recientemente se desarrolló un sistema de desnitrificación soportado por polímeros biodegradables (BPD), que utiliza polímero PHBV (1 % de contenido de hidroxivalerato) como fuente de carbono para tratar las aguas residuales con altas concentraciones de nitrato (Xu y Zhongshuo *et al.* 2018), entre muchas otras aplicaciones que se muestran en la tabla 1 (Anderson y Dawes, 1990) (Rivera-Briso *et al.* 2018).

**Tabla 1. Aplicaciones del P (3HB-co-3HV).**

Copolímero	Aplicaciones
P(3HB-co-3HV)	<p>Material de empaque, productos higiénicos (toallas, pañales y pañuelos), agrícolas y biomédicos, sistemas de liberación y transporte de fármacos, suturas quirúrgicas absorbibles y embalaje médico, parches de tejido, implantes biodegradables, biosensores y la fabricación de andamios porosos que permiten el tratamiento de defectos óseos.</p> <p>Contenedores para productos alimenticios, bolsas, envases, embalajes, y otros productos desechables como, servilletas, rastrillos, vasos y cubiertos.</p> <p>En cascos para ciclistas y tableros de cableado impreso (para electrónica) y varios paneles de automóviles.</p>

Los PHAs son acumulados por bacterias, como fuente de almacenamiento de carbono y energía. Generalmente, su producción se logra mediante un proceso de dos fases. La primera fase (de crecimiento) está relacionada con la producción de biomasa con bajo contenido de polímero; mientras que, la segunda fase (de acumulación), generalmente ocurre si uno de los nutrientes esenciales es limitado (por ejemplo, nitrógeno, fósforo y oxígeno) en el medio de cultivo y simultáneamente hay un exceso de fuente de carbono. Sin embargo, la producción de P (3HB-co-3HV) por bacterias se basa en el suministro de ácido valérico o propiónico como precursor del 3HV además de la fuente de carbohidratos (Rocha *et al.* 2008).

## **2.5 *Azotobacter vinelandii***

*Azotobacter vinelandii* es un organismo aerobio estricto perteneciente a la familia *Pseudomonadaceae* y es cercanamente relacionada al género *Pseudomonas*. Es una bacteria de suelo fijadora de nitrógeno, aún a concentraciones altas de oxígeno (Peña *et al.* 2011), que produce polímeros de importancia industrial como el P3HB y el alginato. *Azotobacter* tiene la capacidad de formar quistes metabólicamente latentes después de un crecimiento exponencial o por inducción de células vegetativas con reactivos específicos (Segura *et al.* 2003).

La morfología de *A. vinelandii* depende en gran medida de las condiciones de cultivo. Normalmente, esta bacteria forma agregados cuando se cultiva con poca agitación, ya sea en matraces agitados o en un fermentador (Peña *et al.* 2002).

Las células de esta especie son móviles por medio de los flagelos peritricos, y las células en división tienen una forma típica de "maní". Los quistes formados intracelularmente son esferoides cuyos ejes son 1.5  $\mu\text{m}$  a 2.0  $\mu\text{m}$ , y por lo tanto tienen volumen del 50% con respecto a las células vegetativas (Sadoff, 1975).

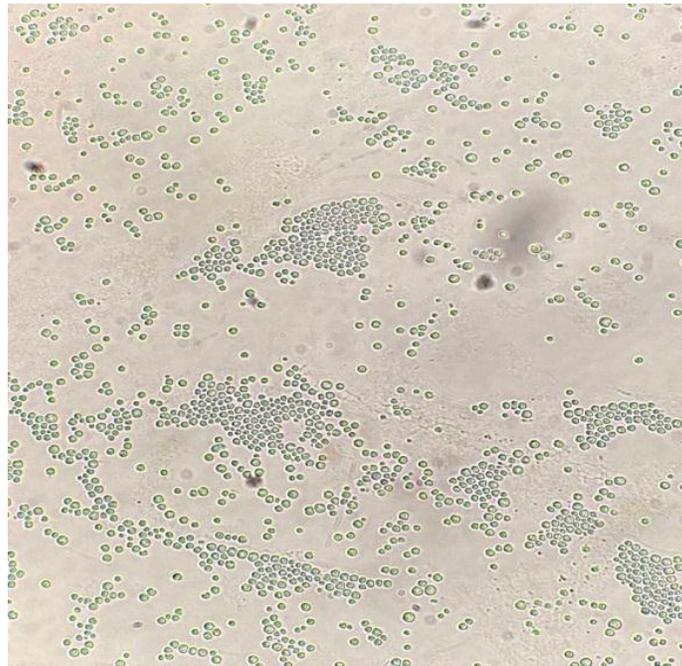
Las cepas modificadas de *A. vinelandii* pueden acumular hasta el 85 % de P3HB con base en su peso seco celular bajo diferentes condiciones de cultivo (Peña *et al.* 2014). Por otro lado, ha sido mencionado que en las cepas mutantes de *Azotobacter* productoras solo de P3HB, la limitación de oxígeno deja de ser un factor esencial en la acumulación de P3HB pero sí en el crecimiento de la bacteria (Sanguino, 2018).

### **2.5.1 *Azotobacter vinelandii* cepa OPNA**

En el Departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología-UNAM, se han diseñado cepas capaces de acumular una mayor cantidad de P3HB. Un ejemplo, es la cepa OPNA, derivada de la cepa OP (mutante espontánea no productora de alginato), y que se muestra en la figura 3.

La cepa OPNA presenta dos mutaciones en los genes *ptsN* y *rsmA* que codifican para proteínas que regulan negativamente la biosíntesis de P3HB (García *et al.* 2019). Una de las proteínas es IIANtr que se encuentra en el sistema de fosfotransferasa relacionada con el metabolismo del nitrógeno (*ptsN*) cuando se encuentra en su estado no fosforilado afecta la expresión del operón de P3HB (Noguez *et al.* 2008). Mientras que, la otra proteína, *rsmA* (proteína pequeña), proveniente del sistema de dos componentes GacS/GacA, se encarga de regular transcripcionalmente la expresión del operón *phb-BAC* y el gen *phbR*, mediante la unión a los RNAs mensajeros inhibiendo así su traducción.

García *et al.* (2014), evaluaron en matraces agitados la producción de polímeros por las cepas mutantes OP y OPNA de *A. vinelandii*, y reportaron que la mayor concentración de P3HB y la mayor productividad se obtenía con la cepa OPNA. Con valores para la cepa OPNA de 75 % de acumulación de P3HB y para la cepa OP, de 73 % de acumulación de P3HB.



**Figura 3** Fotografía de *Azotobacter vinelandii* OPNA vista con objetivo de 40x.

## 2.6 Efecto de las condiciones de cultivo sobre la copolimerización.

Estudios previos han reportado que la acumulación de P3HB en microorganismos, como *Cupriavidus necator* y *Pseudomonas*, se desencadena por limitación de fosfato y/o nitrógeno (N); sin embargo, en el caso de *Azotobacter*, se ha demostrado que la limitación de oxígeno en lugar de la limitación de nitrógeno afecta positivamente a la producción de P3HB (García *et al.* 2019). Por su parte, Díaz-Barrera *et al.* (2016), observaron en cultivos en biorreactores de la cepa OP de *A. vinelandii* (mutante no productora de alginato), bajo diferentes velocidades de agitación, que la biosíntesis de P3HB está influenciada por la velocidad de transferencia de oxígeno (VTO). Estos autores evaluaron la acumulación de P3HB bajo diferentes velocidades de agitación, 300, 400, 500 y 600 rpm; y encontraron que, la acumulación de P3HB máxima ( $70 \pm 3.5\%$  sobre peso seco, a las 6 horas) se alcanzó cuando la VTO fue menor en el cultivo (300 rpm), confirmando que la limitación de oxígeno favorece la acumulación del polímero en respuesta al estrés generado en la bacteria.

En 1989, Page y Knosp reportaron la cepa *Azotobacter vinelandii* UWD, como una cepa mutante que produce P3HB durante la etapa de crecimiento exponencial y es capaz de producir el biopolímero usando una variedad de fuentes de azúcar sin refinar, incluida la remolacha, melaza de caña y jarabe de maíz.

*A. vinelandii* UWD cuando se cultiva en biorreactor es capaz de producir el copolímero PHBV utilizando medio de cultivo suplementado con glucosa y valerato o heptanoato como precursores, logrando acumular 16 y 4.7 % en moles de la fracción 3HV, respectivamente (Urtuvia, 2020). Siendo el valerato el inductor que permite una mayor fracción de 3HV, por tal motivo esta molécula se adicionará a los cultivos realizados en el presente proyecto.

Debido a que existen diferentes trabajos donde se ha encontrado un gran potencial de *A. vinelandii* para la producción de P (3HB-co-3HV), se ha considerado a este microorganismo como una alternativa prometedora para la producción futura de bioplásticos (Page *et al.* 1992).

Desde un punto de vista metabólico, Urtuvia *et al* (2020), reportaron que en *A. vinelandii* OP, el valerato y el heptanoato son asimilados por las células a través de la  $\beta$ -oxidación, generando más energía química equivalente en forma de moléculas de ATP que la oxidación total de carbohidratos (equivalente molar). Estos autores también evaluaron la producción de poli (3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato) (PHBV) por *Azotobacter vinelandii*, en matraces agitados y biorreactores, utilizando diferentes precursores y distintas velocidades de transferencia de oxígeno (VTO). Ellos reportaron el mayor rendimiento de PHBV con base en la sacarosa ( $0.16 \text{ g g}^{-1}$ ) y un contenido de 27.36 % en moles de 3HV en experimentos con *Azotobacter sp.* cultivado en un matraz de 250 ml con 50 ml volumen de llenado, con una agitación de 200 rpm y adicionando valerato ( $1.0 \text{ g L}^{-1}$ ). En cuanto a los cultivos lote en biorreactor, reportaron los resultados que se indican en la Tabla 2. Los dos cultivos se desarrollaron bajo condiciones limitadas de oxígeno y la VTO máxima se varió ajustando la velocidad de agitación. En los cultivos realizados a una baja  $VTO_{m\acute{a}x}$  ( $4.3 \text{ mmol L}^{-1}\text{h}^{-1}$ , a 300 rpm) el contenido de PHBV fue de 73 %  $\text{g g}^{-1}$ ; mientras que, con una  $VTO_{m\acute{a}x}$  más alta ( $17.2 \text{ mmol L}^{-1}\text{h}^{-1}$ , a 600 rpm) se mejoró la fracción máxima de 3HV (35 % mol). Los hallazgos obtenidos sugieren que la producción de PHBV y el contenido de 3HV incorporado en el polímero se vieron afectados por la VTO. Esto es, una mayor VTO, favoreció en el porcentaje mol del 3HV, mientras que, una VTO más limitada permitió una mayor producción del biopolímero.

**Tabla 2. Resumen de la producción de PHBV por *A. vinelandii* OP en biorreactor a diferentes tasas de agitación reportada por Urtuvia *et al.* (2020).**

rpm	$VTO_{m\acute{a}x} (\text{mmolL}^{-1}\text{h}^{-1})$	PHBV (% $\text{g g}^{-1}$ )	Fracción 3HV (mol %)
300	$4.3 \pm 0.7$	$73.3 \pm 4.6$	$18.6 \pm 6.4$
600	$17.2 \pm 1.2$	$63.8 \pm 4.6$	$35.0 \pm 6.7$

Por su parte, Torres (2020), evaluó el efecto de tres factores de cultivo (concentración del precursor, la velocidad de transferencia de oxígeno, VTO, y el tiempo de adición) los cuales se ha informado que pueden modular la composición monomérica de los copolímeros.

Estos parámetros de cultivo fueron evaluados en matraces agitados de 500 ml, utilizando la cepa OPNA de *A. vinelandii*. Mediante un diseño factorial, se encontró que, a las 48 h de cultivo, la fracción molar más alta de 3HV ( $28 \pm 2.3 \%$ ) se obtuvo mediante la adición de ácido valérico a una concentración de 40 mM, después de 12 h de cultivo, en cultivos con 100 ml de volumen de llenado, es decir, una condición de  $VTO_{m\acute{a}x}$  de  $5.8 \text{ mmol L}^{-1}\text{h}^{-1}$ . Una vez seleccionadas las condiciones que mejor favorecieron el porcentaje de HV en el copolímero, los mismos autores hacen una nueva evaluación de manera más rigurosa, bajo las mismas condiciones ( $VTO$  de  $5.8 \text{ mmol L}^{-1}\text{h}^{-1}$  y 40 mM de ácido valérico con un tiempo de inducción de 12 horas), y encuentran hasta un 39 % de HV.

Por otro lado, se observa que el porcentaje máximo de acumulación de PHAs fue de  $22 \pm 2.4 \%$ , y este valor máximo es obtenido antes de la adición del precursor.

Adicionalmente, estos autores observaron que en los cultivos realizados en biorreactor, donde se utilizó una concentración alta (40 mM) del precursor y una  $VTO_{m\acute{a}x}$  de  $20 \text{ mmol L}^{-1}\text{h}^{-1}$ , después de seis horas de haber adicionado el ácido valérico, el porcentaje de acumulación de PHBV comenzó a incrementar hasta obtenerse un máximo porcentaje de  $51.0 \pm 3.6$  a las 21 horas de cultivo. A este tiempo, la concentración del polímero fue de  $3.3 \pm 0.3 \text{ g L}^{-1}$ . En cuanto al contenido de 3HV, se obtuvo  $21 \pm 0.5 \%$  a las 15 h de cultivo. Por otro lado, en cultivos con menor concentración de precursor (10 mM), la mayor producción de 3HV alcanzada fue de  $8.2 \pm 0.03 \%$  a las 12 horas de cultivo. En esta última condición el porcentaje y concentración de PHAs son más altos ( $80 \pm 0.7 \%$  y  $6.1 \pm 0.9 \text{ g L}^{-1}$ ) a los obtenidos en los cultivos realizados con una mayor concentración del precursor.

Estos resultados revelaron que, al aumentar la concentración del precursor de 10 a 40 mM, es posible aumentar el contenido de 3HV. Es importante señalar que la fracción molar de 3HV aumentó con la concentración de ácido valérico; sin embargo, bajo esta condición la acumulación de PHBV disminuyó.

Los resultados de Torres (2020), concuerdan con los obtenidos por Urtuvia *et al* (2020), ya que al usar una  $VTO_{m\acute{a}x}$  más alta, se logró un incremento en el porcentaje mol de 3HV en comparación a los cultivos con una  $VTO_{m\acute{a}x}$  menor. Los valores del porcentaje de HV, reportados por cada autor, parecen ser muy similares. Sin embargo, Urtuvia *et al* (2020),

experimentan un rango de concentraciones de precursor más limitado a diferencia de Torres, quien establece un rango más amplio y solo experimenta los extremos del mismo.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Tomando en consideración los trabajos anteriormente mencionados, y por las investigaciones realizadas con referencia a la producción del copolímero P (3HB-co-3HV) surgió la necesidad de experimentar velocidades de transferencia de oxígeno aún más altas de las ya reportadas, para conocer si el efecto positivo en el % mol del 3HV continúa presentándose u ocurre un efecto contrario, estableciéndose un rango de VTO alto, y así determinar la condición de VTO que más favorece la copolimerización. De igual manera se emplearán diferentes concentraciones del precursor que permitan evitar en lo posible la inhibición en la producción y acumulación de PHAs, provocada por el mismo, a su vez este estudio podría permitir la biosíntesis de copolímeros con diferentes propiedades mecánicas para una amplia gama de aplicaciones.

### **4. HIPÓTESIS**

El incremento de la VTO y el cambio en la concentración del precursor (ácido valérico) en cultivos en matraces agitados con la cepa OPNA de *Azotobacter vinelandii*, permitirá obtener copolímeros con una composición mayor al 39 % en la fracción del 3HV y un porcentaje de acumulación mayor al 25 %.

### **5. OBJETIVOS**

#### **5.1 General**

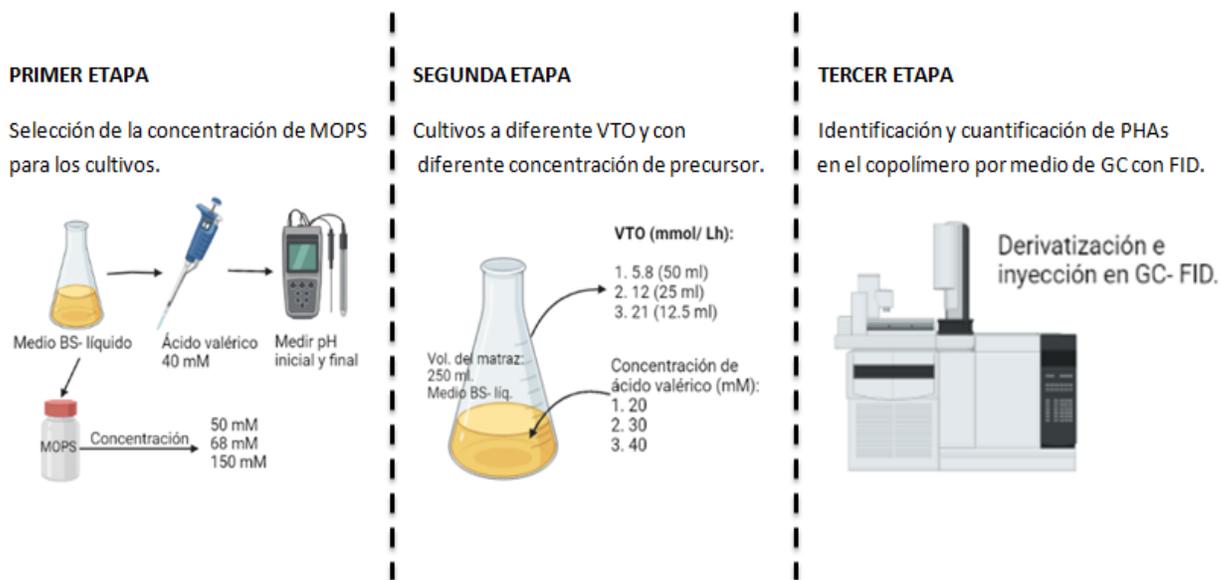
Evaluar el efecto de la velocidad de transferencia de oxígeno máxima y la concentración del precursor sobre la cinética de crecimiento y el porcentaje del 3HV en la composición del P (3HB-co-3HV).

## 5.2 Específicos

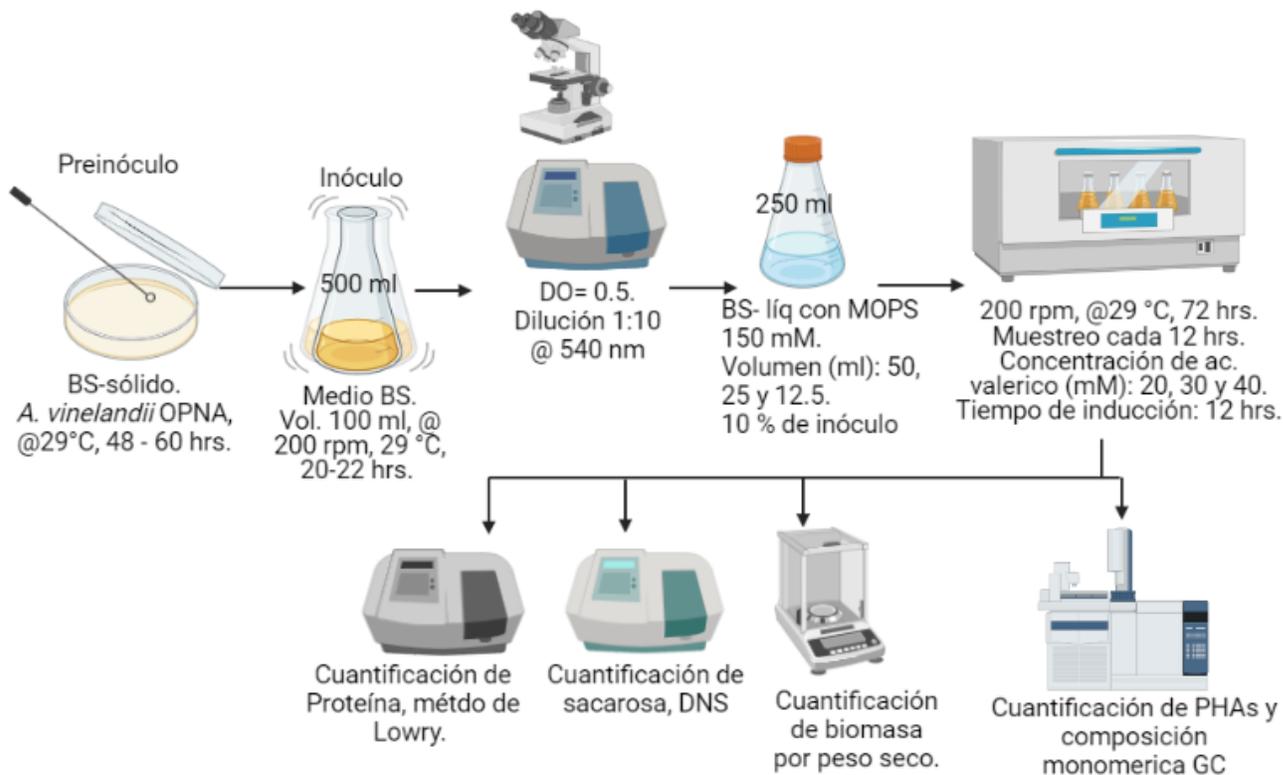
- ✓ Analizar el efecto de la  $VTO_{máx}$  en el rango de (5.8 a 21  $mmol/L h$ ) sobre la producción y composición de PHAs en cultivos en matraces agitados.
- ✓ Evaluar el efecto de la concentración del ácido valérico sobre la producción y composición de PHAs en cultivos en matraces agitados.

## 6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

El presente proyecto se realizó en tres etapas. En la figura 4 se presenta un diagrama general de la estrategia experimental llevada a cabo. Se utilizó la cepa OPNA de *A. vinelandii*. Debido a que el precursor es un ácido, y el microorganismo modelo de este proyecto exige un pH cercano a 7.2 para su ideal crecimiento; se vio la necesidad de utilizar un amortiguador de pH (MOPS) que permitiera mitigar la caída del potencial de hidrógeno. Debido a lo anterior, en la primera etapa se seleccionó la concentración de MOPS a utilizar durante los cultivos. En la etapa 2, se llevaron a cabo los cultivos a diferentes VTOs y con diferentes concentraciones de precursor, también se realizaron las determinaciones de cuantificación de proteína, sacarosa, biomasa y PHB, como se muestra en la figura 4.1. Finalmente, en la etapa 3, se derivatizaron las muestras para posteriormente determinar la composición del copolímero obtenido mediante cromatografía de gases con detector de ionización de flama.



**Figura 4 Estrategia experimental**



**Figura 4.1 Metodología para los cultivos y determinaciones analíticas realizadas.**

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 Cepa

Se utilizó la cepa modificada RsmA::sp / PtsN::km (OPNA) de *A. vinelandii*. Cepa sobreproductora de P3HB.

#### 7.1.1 Preservación de la cepa

La cepa se preservó en medio Burk-sacarosa líquido y glicerol al 30 % a -70 °C.

#### 7.1.2 Medio de cultivo

Se utilizó el medio Burk-sacarosa solidificado con agar (18 g/L), complementado con kanamicina ( $1 \mu\text{gL}^{-1}$ ) y espectinomicina ( $8.3 \mu\text{gL}^{-1}$ ) para la reactivación de la cepa en caja Petri y para realizar las cinéticas de crecimiento se empleó el medio Burk-sacarosa líquido sin antibióticos.

La composición del medio de cultivo BS- líquido se muestra en la tabla 3. El medio Burk-sacarosa sólido contiene los mismos reactivos y concentraciones señalados en la tabla 3, sin extracto de levadura y MOPS. El pH del medio sólido y líquido se ajusta a 7.2 con una solución concentrada 2 N de NaOH.

Las sales de potasio, la sacarosa, el extracto de levadura y el MOPS se disolvieron en 900 mL de agua destilada y se ajustó el pH a 7.2. A su vez, el sulfato de calcio se disolvió en 50 mL de agua destilada, y las sales restantes también fueron disueltas en 50 mL de agua destilada. Con el objeto de evitar precipitaciones, las tres fracciones se esterilizaron por separado a 121 °C durante 20 minutos y una vez estériles se mezclaron en la campana de flujo laminar.

**Tabla 3. Composición del medio Burk-Sacarosa líquido.**

Reactivo	Concentración en $g L^{-1}$
<i>Sacarosa</i>	20
<i>Extracto de levadura</i>	3
<i>MOPS</i>	31
$K_2HPO_4$	0.66
$KH_2PO_4$	0.16
$CaSO_4$	0.05
<i>NaCl</i>	0.2
$MgSO_4$	0.2
$NaMoO_4 \cdot 2H_2O$	0.0029
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.027

Para promover la biosíntesis de PHBV, se añadió el ácido valérico al medio sin neutralizar durante la fase de crecimiento exponencial (cuando la biosíntesis de P3HB es más activa), a la concentración final de 20, 30 y 40 mM. El ácido valérico fue previamente esterilizado mediante filtración en membrana de 0.22  $\mu m$ .

## 7.2 DESARROLLO DE CULTIVOS.

### 7.2.1 Pre-inóculo

Se sembraron cajas utilizando dos asadas de la cepa OPNA de *A. vinelandii* proveniente de un glicerol, se incubaron a 29 °C durante 48 a 60 horas en medio Burk-sacarosa sólido suplementado con kanamicina y espectinomicina ( $1 \mu\text{g L}^{-1}$  y  $8.3 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente).

### 7.2.2 Preparación del inóculo para los cultivos en matraz de 250 mL.

A partir de las colonias de la cepa OPNA generadas en cajas Petri, se tomaron dos asadas y se inoculó en medio BS-líquido en un matraz de 500 mL, con un volumen de llenado de 100 mL del medio. El inóculo se incubó a 29 °C y 200 rpm, hasta que alcanzó una densidad óptica (leída a 540 nm) con una dilución 1:10, de 0.5, aproximadamente 20 - 22 horas.

Posteriormente, con la finalidad de evaluar diferentes velocidades de transferencia de oxígeno, se realizaron cultivos durante 72 horas, utilizando volúmenes de llenado de 50 mL, 25 mL, y 12.5 mL en matraces de 250 mL. Se inocularon con el 10 % del volumen total.

Cada 12 horas un matraz se sacrificó para mediciones analíticas. Todos los experimentos se realizaron por duplicado.

### 7.2.3 Estimación de la $VTO_{m\acute{a}x}$ en los cultivos.

La velocidad de transferencia de oxígeno máxima se determinó con la ecuación 1. Ecuación propuesta por Maier y Büchs (2001),

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

Ecuación 1.

Dónde:

$n$  = Frecuencia de agitación (rpm)

$V_L$  = Volumen de llenado (mL)

$d_0$  = Diámetro de agitación (cm)

$d$  = Diámetro máximo del matraz de agitación (m)

## 8. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

### 8.1 Determinación de biomasa por peso seco

Se determinó la concentración de biomasa mediante el método gravimétrico de peso seco. Se tomaron 2 mL de caldo de cultivo, se filtraron en membranas previamente taradas. Las membranas se secaron en horno durante 48 horas a 60 °C, luego se colocaron en un desecador durante 1.5 horas. Finalmente se pesaron y por diferencia de peso se obtuvo la cantidad de biomasa, expresada en  $g L^{-1}$ .

### 8.2 Determinación de proteína de la biomasa celular

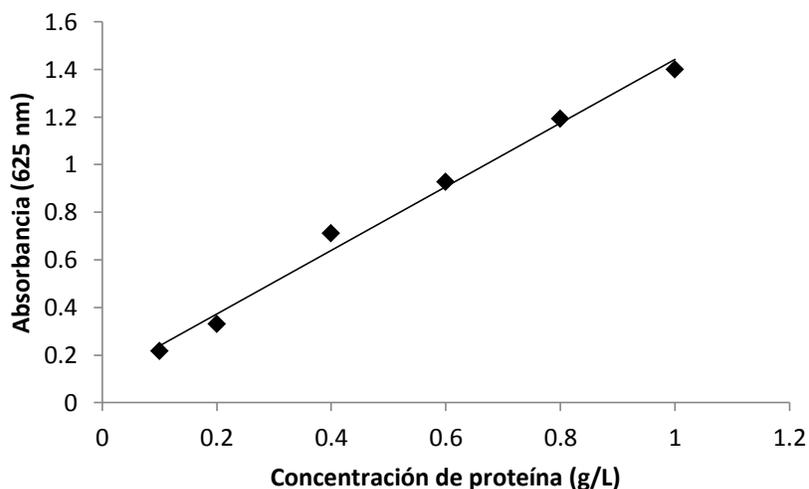
La concentración de proteína se determinó mediante el método colorimétrico de Lowry, usando albumina bovina como estándar. La adición del reactivo de Folin, incrementa la aparición de color azul, cuya densidad óptica es medida a 625 nm y, es proporcional a la concentración de proteína presente (Lowry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

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

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

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

El procedimiento fue el siguiente: se tomó 1 mL de la muestra de caldo de cultivo y se centrifugó a 11000 rpm durante 15 minutos. El precipitado se resuspendió en agua destilada (aplicando una dilución conforme a la cantidad de muestra). Después, se tomaron 200  $\mu\text{L}$  de la muestra y se adicionó 1 mL de la solución reactiva. Se agitó en vortex y se dejó reposar durante 10 minutos. Posteriormente, se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  del reactivo de Folin y se agitó en vortex, se dejó reposar en oscuridad durante 30 minutos. Posteriormente, las muestras se centrifugaron por 2 minutos a 11000 rpm, con el fin de evitar interferencias de sólidos disueltos de los polímeros en la medición. Se determinó la absorbancia a 625 nm en un espectrofotómetro, contra un blanco (mezcla de reactivos y agua destilada). Se realizó una curva patrón (Fig. 5) utilizando albúmina bovina (Sigma), en concentraciones de 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0  $\text{g L}^{-1}$ .



**Figura 5** Curva estándar de proteína para la cuantificación de proteína total.

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

$$Proteína \left( \frac{g}{L} \right) = \left( \frac{Absorbancia - 0.1056}{1.3372} \right) * Dilución$$

Ecuación 2.

### 8.3 Cuantificación de sacarosa.

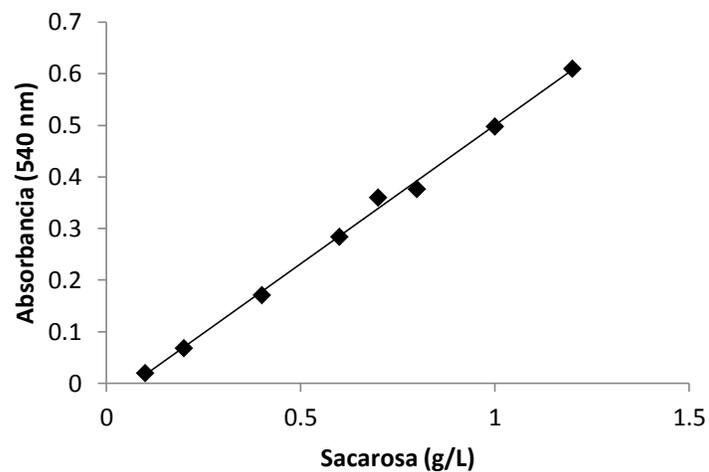
El método de la  $\beta$ - fructofuranosidasa- DNS se basa en la hidrólisis de la sacarosa usando la enzima invertasa y la posterior medición de los azúcares reductores libres por la reducción del ácido 3,5- dinitrosalicílico (DNS). En la reacción se forma un compuesto nitro-aminado colorido (amarillo), cuya densidad óptica medida a 540 nm es proporcional a la concentración de grupos reductores.

**Solución DNS:** Se preparó pesando 16 g de NaOH, 300 g de tartrato de sodio y potasio y 10 g de DNS, se mezclaron en 1 L de agua destilada, con adición lenta del DNS para evitar su precipitación.

**Amortiguador de citratos pH 4.6:** Se preparó disolviendo 0.197 g de ácido cítrico en 50 mL de agua destilada. De forma independiente, se disolvió 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 preparó mezclando 2.5 mg de la enzima  $\beta$ -fructofuranosidasa (Sigma-Aldrich) con 1 mL de amortiguador de citratos (0.35 M, pH 4.6).

Se tomó una alícuota de 1 mL de caldo de fermentación y se hizo una dilución 1/20 con agua destilada. Se tomó una muestra de 90  $\mu$ L y se adicionaron 10  $\mu$ L de la solución enzimática, en seguida se agito y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos. Posteriormente, se adicionaron 100  $\mu$ L de DNS. Los tubos de cada muestra se llevaron a ebullición en baño maría durante 5 minutos y fueron enfriados en hielo. Finalmente, se les adicionó 1 mL de  $H_2O$  destilada, se agito y se midió la densidad óptica a 540 nm.



**Figura 6** Curva patrón de sacarosa para la cuantificación de sacarosa por el método  $\beta$ -fructofuranosidasa-DNS.

Para realizar la cuantificación de sacarosa en el medio de cultivo de cada muestra, se empleó la siguiente ecuación:

$$Sacarosa \left( \frac{g}{L} \right) = \left( \frac{Absorbancia - 0.0177}{0.5134} \right) * Dilución$$

Ecuación 3.

#### **8.4 Cuantificación e identificación de PHAs por cromatografía de gases (GC) con detector de ionización de flama (FID)**

La cuantificación y determinación de la composición monomérica de los PHAs se realizó mediante cromatografía de gases. Los PHAs fueron convertidos a productos estables y volátiles a las temperaturas de la columna del cromatógrafo de gases. Esto se consigue por la conversión del PHA en los metil ésteres correspondientes de los hidroxiacilos constituyentes del polímero.

Los metil-ésteres interactúan específicamente con la fase sólida de la cromatografía de gases, lo que permite la separación de los diferentes metil-ésteres de los hidroxialcanoatos. La medición del tiempo de retención y el área bajo la curva resultante de las señales del detector en el cromatograma, permiten su identificación y cuantificación.

Para la identificación de los componentes de los PHAs producidos (HB y HV), se utilizó como estándar: Ácido (R)- 3-hidroxibutírico y metil valerato del proveedor Sigma-Aldrich. Se utilizó benzoato de metilo como estándar interno (Methyl benzoate, Sigma-Aldrich) en todas las muestras.

Se generó una gráfica de calibración de P3HB para la cuantificación del contenido celular de PHAs. Se utilizó P3HB del proveedor Sigma- Aldrich, para la curva se emplearon concentraciones de: 2, 4, 6, 8 y 10 mg/mL. El P3HB utilizado para la curva, se sometió a un proceso de derivatización, mientras que para la curva de HV se utilizó el estándar metil valerato del proveedor Sigma- Aldrich utilizando concentraciones de: 0.2, 2, 4, 6 y 8 mg/mL. Los estándares fueron inyectados en el cromatógrafo de gases, tanto para conocer su tiempo de retención, y para la posterior cuantificación de PHAs en las muestras.

Se realizó el proceso de derivatización de PHAs para todas las muestras obtenidas de los cultivos realizados, como se describe en la sección 8.4.1.

#### 8.4.1 Derivatización de PHAs.

Se utilizó el procedimiento de Juengert *et al*, (2018) con algunas modificaciones.

Se centrifugaron 12 mL de caldo de cultivo para recuperar la biomasa de cada muestra. Se pesaron 10 mg de biomasa liofilizada o secada, se adicionó 1 ml de cloroformo, se agitó en vortex y se dejó reposar de 20 a 30 minutos. Posteriormente, se adicionó 1 mL de metanol suplementado con  $H_2SO_4$  (15 % v/v), se volvió a agitar en vortex y sin apretar la tapa de los tubos de derivatización, se incubaron 2 horas 30 minutos a 100 °C ó 6 horas a 80 °C. En seguida se libera la presión dentro de los tubos y se enfrían en hielo durante 5 minutos y después se adiciona 1 mL de agua destilada y 1 mL de cloroformo con benzoato de metilo al 0.2 %, se agitó en vortex (30 segundos). Por último, se toma la fase orgánica en tubos Eppendorf de 2mL, se centrifuga a 10 000 rpm por 3 min y se pasó a un nuevo tubo, evitando tomar la fase inorgánica de la superficie.

#### 8.5 Crecimiento microbiano y ecuación logística.

Los datos de la cinética de crecimiento microbiano de determinaron por la ecuación logística:

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

Ecuación 4.

Donde  $\mu$  es la velocidad específica de crecimiento ( $h^{-1}$ ) y  $X_{m\acute{a}x}$  la concentración máxima de biomasa ( $g L^{-1}$ ). Integrando la ecuación anterior, considerando que  $X_0 = X(t = 0)$  y reordenando los términos se obtuvo la ecuación 5, que describe el crecimiento bacteriano en el tiempo.

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

Ecuación 5.

Gómez- Pazarín *et al.* 2016.

## 9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 9.1 Valores de pH en función de la concentración de MOPS

Clementi *et al.* (1995), demostraron que la producción de alginato, por *A. vinelandii*, en presencia de MOPS aumentó en 2.5 veces, lo que demuestra la importancia primordial del control de pH durante el proceso de fermentación.

Por tal motivo, el ácido 3-(N-morfolino)-propano-sulfónico (MOPS), generalmente se agrega al medio para mantener el pH constante, durante el cultivo de la bacteria (Peña *et al.* 2006).

Para mitigar la caída de pH en el medio de cultivo, cuando se agrega el ácido valérico, se procedió a evaluar la concentración del amortiguador de pH (MOPS), para lo cual, se preparó el medio BS líquido con diferentes concentraciones de MOPS, para seleccionar la concentración que permita mantener el pH más cercano a 7.2, después de la adición del precursor.

Se evaluaron tres concentraciones de MOPS, las cuales fueron 10.45, 14.2 y 31 g/L (50, 68 y 150 mM, respectivamente). Se realizó una corrida de prueba, la cual consistió únicamente en medio BS (sin la bacteria) y se adicionó el precursor al medio en agitación, en concentraciones de 20 y 40 mM. Los cambios del pH para la corrida de prueba se muestran en la tabla 4.

NOTA: El valor inicial del pH fue de 7.2.

**Tabla 4. Cambios en el pH en función de la concentración de MOPS en el medio.**

Concentración de MOPS (mM)	40 mM de ácido valérico	20 mM de ácido valérico
	pH final	
50	5.15	6.49
68	5.68	6.7
150	6.77	6.99

Debido a que el pH óptimo de *Azotobacter vinelandii* es entre 7.0 y 7.5, se eligió la concentración de 150 mM de MOPS, para mitigar la caída de pH en los cultivos.

A continuación, la tabla 5 muestra los resultados del cambio que hubo en el pH de los cultivos, utilizando la concentración de MOPS anteriormente mencionada.

**Tabla 5. pH final de cultivos con concentraciones de precursor de 20, 30 y 40 mM, empleando MOPS con una concentración de 150 mM.**

Concentración del ácido valérico (mM)	pH final (72 horas de cultivo)
20	7.20
30	7.19
40	7.16

## 9.2 Influencia de la concentración de ácido valérico sobre el crecimiento medido como proteína en distintas condiciones de $VTO_{máx}$ .

En la figura 7 se presenta la cinética de crecimiento de la cepa OPNA cultivada bajo diferentes concentraciones de ácido valérico (20, 30 y 40 mM) y bajo distintas velocidades de transferencia de oxígeno (VTO). Se observa que al incrementar la  $VTO_{máx}$  del cultivo en el rango de (5.8 a 21 mmol/L h), hay un aumento en la concentración máxima de proteína y la velocidad de crecimiento. Así, a una  $VTO_{máx}$  de 21 mmol/L h se alcanzaron valores de

proteína máxima de  $1.74 \pm 0.08$ ,  $1.73 \pm 0.27$  y  $1.61 \pm 0.19$  g/L para las concentraciones de 20, 30 y 40 mM, respectivamente. En contraste, para una  $VTO_{m\acute{a}x}$  de 5.8 mmol/L h, la concentración de proteína fue de  $1.35 \pm 0.20$ ,  $1.32 \pm 0.36$  y  $1.19 \pm 0.08$  g/L, para 20, 30 y 40 mM, respectivamente. Estos valores representan alrededor del 20 % de la biomasa.

Se estimó la velocidad específica de crecimiento a partir de los datos de proteína, ya que, ha sido reportado que el método gravimétrico no permite diferenciar entre los cambios en la población celular y la acumulación de PHAs (García, 2014). Cada uno de los puntos de las figuras representa el promedio de 2 cultivos independientes.

Es importante destacar que, para cada condición de  $VTO_{m\acute{a}x}$ , los valores de las velocidades de crecimiento para cada concentración de ácido valérico usada, son iguales a excepción de los valores calculados a una  $VTO_{m\acute{a}x}$  de 21 mmol/L h, donde a baja concentración de ácido valérico (20 mM) la velocidad es ligeramente mayor con respecto a 30 mM y 40 mM de ácido valérico (Tabla 6,7 y 8). Estos resultados muestran la poca influencia que tiene el precursor en estas concentraciones, sobre el crecimiento de la cepa OPNA con base en la cuantificación de proteína.

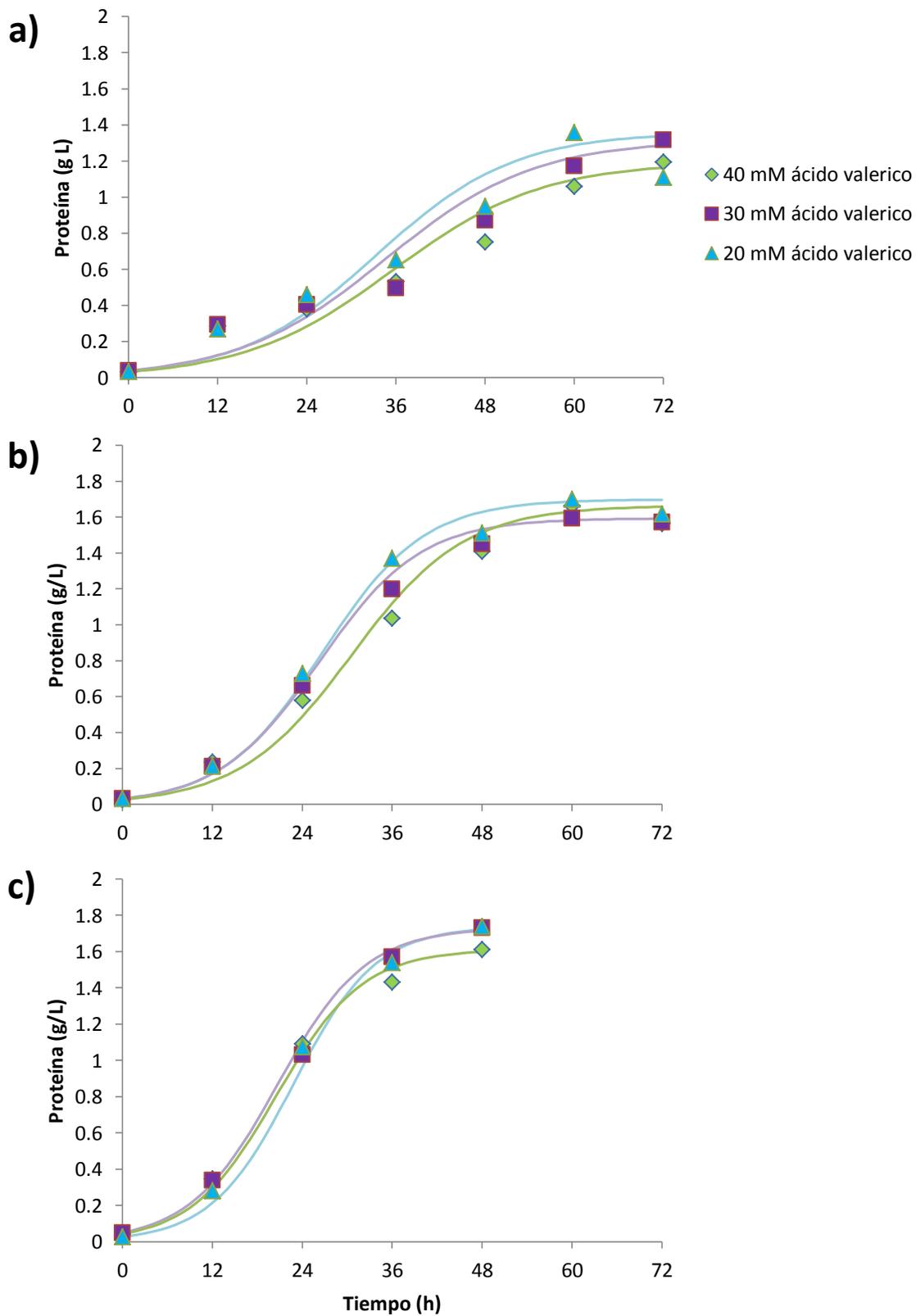


Figura 7 Efecto de la concentración del ácido valérico sobre el crecimiento de proteína a una  $VTO_{m\acute{a}x}$  de 5.8 mmol/ L h (a); a una  $VTO_{m\acute{a}x}$  de 12 mmol/ L h (b) y a una  $VTO_{m\acute{a}x}$  de 21 mmol/ L h (c).

Estudios previos con esta cepa, como el trabajo de Torres *et al.* (2021), demuestran que cuando se cultiva la cepa OPNA a una  $VTO_{m\acute{a}x}$  de 5.8 mmol/L h, utilizando una concentración del precursor de 40 mM, se obtuvo una velocidad de crecimiento inicial de  $0.043 \pm 0.006 h^{-1}$ , este valor fue calculado antes de la adición del ácido valérico. Calculando la velocidad de crecimiento en ese período con los datos del presente proyecto, se obtiene un valor de  $0.102 \pm 0.03 h^{-1}$ . La diferencia de los resultados puede deberse al cambio de la fuente de nitrógeno, dado que en el trabajo de Torres *et al.* (2021) se empleó sulfato de amonio; mientras que en este trabajo se utilizó extracto de levadura. Se sabe que en cepas de *A. vinelandii* no productoras de alginato la adición del extracto de levadura incrementa el crecimiento, la producción y acumulación de P3HB (Ryu *et al.* 2008), debido a que la adición de extracto de levadura no solo proporciona nitrógeno, también contiene minerales y vitaminas que podrían emplearse como factores para el crecimiento (Torres *et al.* 2021).

**Tabla 6. Velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación en función de la concentración de ácido valérico a una  $VTO_{m\acute{a}x}$  de 5.8 mmol/L h**

Concentración ácido (mM)	$\mu (h^{-1})$	$t_{Duplicación} (h)$
40	$0.03 \pm 0.00$	23.1
30	$0.03 \pm 0.00$	23.1
20	$0.03 \pm 0.00$	23.1

**Tabla 7. Velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación en función de la concentración de ácido valérico a una  $VTO_{m\acute{a}x}$  de 12 mmol/L h**

Concentración ácido (mM)	$\mu (h^{-1})$	$t_{Duplicación} (h)$
40	$0.1 \pm 0.03$	6.93
30	$0.1 \pm 0.04$	6.93
20	$0.1 \pm 0.04$	6.93

**Tabla 8. Velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación en función de la concentración de ácido valérico a una  $VTO_{m\acute{a}x}$  de 21 mmol/L h**

Concentración ácido (mM)	$\mu$ ( $h^{-1}$ )	$t_{Duplicación}$ (h)
40	$0.13 \pm 0.02$	5.33
30	$0.13 \pm 0.03$	5.33
20	$0.15 \pm 0.01$	4.62

En la figura 7b, se logra observar que, existe un mayor crecimiento a una velocidad de transferencia de oxígeno de 12 mmol/L h que a una  $VTO_{m\acute{a}x}$  de 5.8 mmol/L h, alcanzándose un valor de proteína máximo de  $1.7 \pm 0.14$  g/L, con una concentración de precursor de 20 mM. Para esta condición de  $VTO_{m\acute{a}x}$ , los valores de velocidad de crecimiento respecto a la concentración del ácido valérico (tabla 7), son mayores que los obtenidos con una  $VTO_{m\acute{a}x}$  de 5.8 mmol/L h (tabla 6).

En la figura 7c y la tabla 8 se observa que la velocidad de crecimiento es mayor a una alta  $VTO_{m\acute{a}x}$  que las calculadas a bajas VTOs. Es decir, un incremento en la VTO influye positivamente en el crecimiento, lo cual se ve reflejado en la velocidad de crecimiento y la concentración máxima de proteína.

Para esta condición de  $VTO_{m\acute{a}x}$  (21 mmol/L h), la  $\mu$  más alta ( $0.15 \pm 0.01$ ) fue con la concentración de 20 mM de ácido. Se puede observar en la figura 7c una mayor concentración de proteína en los cultivos cuando se usó una concentración de precursor de 30 mM.

A las 48 horas de cultivo, se puede observar que el valor de proteína más alto ( $1.73 \pm 0.27$  g/L) fue alcanzado con una concentración de precursor de 30 mM. Y en la figura 7b se puede observar que, ese valor es muy parecido al valor de proteína máximo que se alcanzó con una  $VTO_{m\acute{a}x}$  de 12 mmol/L h, que fue de  $1.7 \pm 0.14$  g/L, a las 60 horas de cultivo.

En la figura 7c, es importante mencionar que los valores de proteína obtenidos con la concentración de 40 mM, son los más bajos a partir de las 36 horas de cultivo.

Se sabe que en microorganismos aeróbicos, como es el caso de *A. vinelandii* un incremento en la disponibilidad de oxígeno favorecen la duplicación celular y por tanto la

concentración de proteína en el cultivo. Mientras que al disminuir la disponibilidad de oxígeno hay un aumento en la acumulación de P3HB.

### **9.3 Influencia de la concentración de ácido valérico sobre el crecimiento de biomasa en distintas condiciones de VTO máx.**

En la figura 8 se muestran las cinéticas de crecimiento con base a biomasa de los cultivos con tres distintas concentraciones de precursor evaluadas bajo diferentes VTOs. Se observa que la concentración de ácido valérico no tiene un efecto significativo sobre el crecimiento medido como biomasa. Para este caso, al igual que el crecimiento medido como proteína, el crecimiento de biomasa sigue también una tendencia de un modelo logístico. Lo cual coincide con lo reportado por Klimek y Ollis (1980) de que el crecimiento de biomasa de *A. vinelandii* se adapta al modelo logístico establecido por la ecuación 4 (Materiales y métodos).

La figura 8a muestra que, los valores de biomasa (medida como peso seco) con la concentración más alta del precursor (40 mM), son ligeramente más bajos. Los valores de biomasa máximos, a las 72 horas de cultivo, fueron de  $10.95 \pm 1.4$ ,  $10.7 \pm 1.2$  y  $10.35 \pm 0.1$  g/L, para 20, 30 y 40 mM, respectivamente.

La figura 8b muestra que, para esta condición de VTO, los valores de biomasa máxima se alcanzaron a las 48 horas de cultivo y, fueron de  $8.1 \pm 0.7$ ,  $9.0 \pm 0.07$  y  $9.1 \pm 0.56$  g/L, para las concentraciones de 20, 30 y 40 mM de precursor, respectivamente. En comparación con los valores máximos de biomasa obtenidos a una VTO de 5.8 mmol/L h, estos valores disminuyeron un poco más de 1 g/L.

En la figura 8c se puede observar que, la concentración máxima de biomasa para la condición de  $VTO_{máx}$  más alta, disminuyó considerablemente en comparación con los resultados obtenidos con una  $VTO_{máx}$  de 5.8 mmol/L h. Los valores de biomasa máxima se alcanzaron a las 36 h de cultivo, y fueron de,  $6.85 \pm 0.32$ ,  $7.47 \pm 0.78$  y  $7.2 \pm 1.1$  g/L, para las condiciones de concentración de ácido valérico de 20, 30 y 40 mM, respectivamente.

Se sabe que una velocidad de transferencia de oxígeno baja, en *A. vinelandii*, promueve la síntesis de P3HB; mientras que a valores altos de VTO, la bacteria utiliza la fuente de carbono principalmente para el crecimiento celular; (García *et al*, 2014).

Por otro lado, Padilla-Córdova *et al.* (2020), reportaron que usando la cepa OP de *A. vinelandii*, la velocidad de agitación, y por lo tanto, la VTO, afectó las concentraciones máximas de biomasa, variando entre 9,7 y 13,6 g/L, dependiendo de la velocidad de agitación del cultivo. La mayor concentración de biomasa ( $13,6 \pm 0,5$  g/L ) se obtuvo a las 54 h de cultivo en los cultivos a 800 rpm. En los cultivos agitados a 1000 rpm se alcanzó una menor concentración de biomasa ( $11,8 \pm 0,1$  g/L). Teniendo en cuenta que la biomasa se midió como peso seco, incluido el P3HB, la baja biomasa obtenida a 1000 rpm podría deberse a un contenido de P3HB más bajo (Padilla-Córdova *et al.* (2020).

Tomando en consideración esto, y observando en la figura 8 que, un incremento en la  $VTO_{m\acute{a}x}$  provoca una disminución de la concentración de biomasa máxima, se puede decir que el decremento de biomasa de 10.6 g/L a 7.2 g/L al incrementar la VTO de 5.8 a 21 mmol/L h, se podría deber a un menor contenido de PHAs en la biomasa.

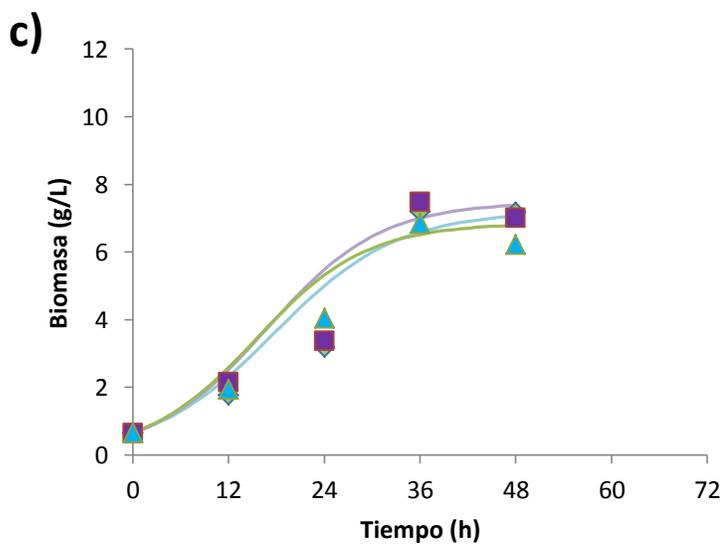
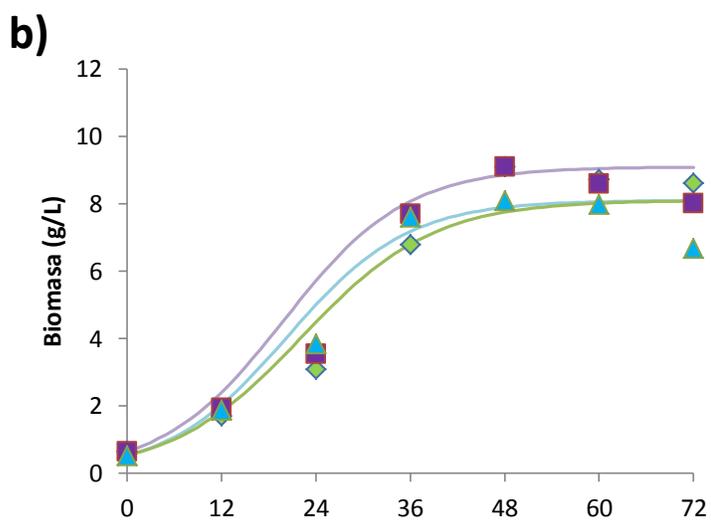
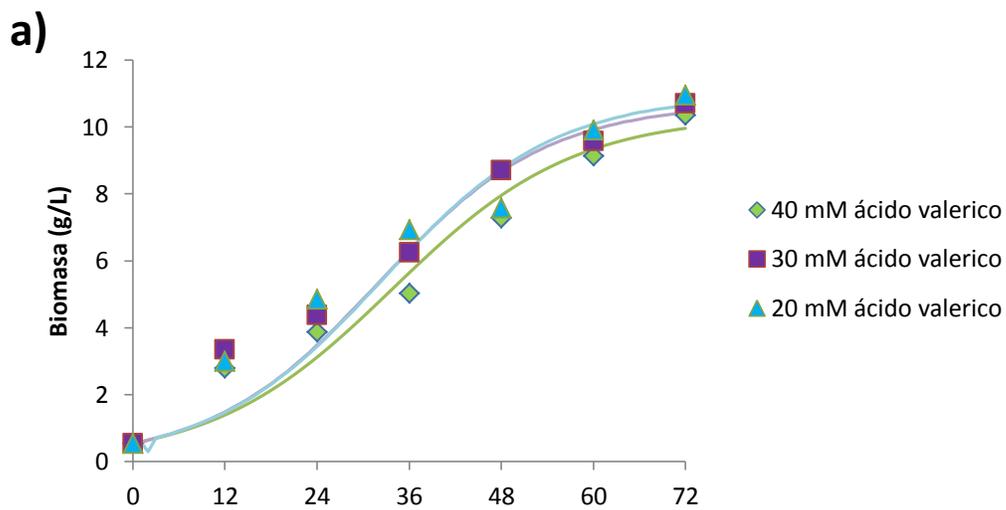


Figura 8 Efecto de la concentración del ácido valérico sobre el crecimiento de biomasa a una  $VTO_{m\acute{a}x}$  de 5.8 mmol/ L h (a); a una  $VTO_{m\acute{a}x}$  de 12 mmol/ L h (b) y a una  $VTO_{m\acute{a}x}$  de 21 mmol/ L h (c).

#### **9.4 Consumo de sacarosa en función de la concentración de precursor a diferentes $VTO_{máx}$ .**

También se cuantificó la concentración de sacarosa a través del tiempo de cultivo.

La figura 9 muestra que, en todos los casos la fuente de carbono se agotó antes de terminar las 72 horas de cultivo.

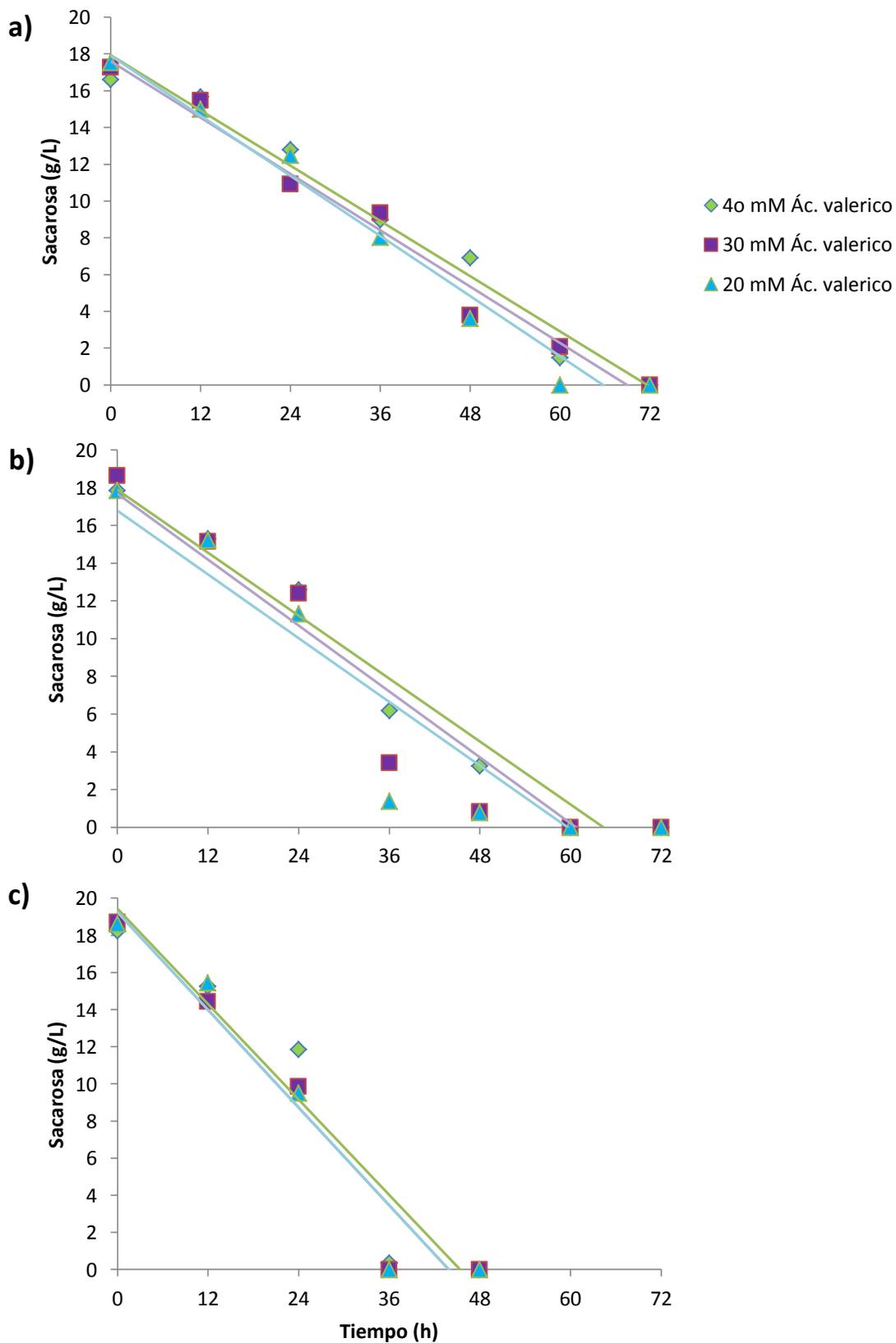
En la figura 9a se presenta el consumo de sacarosa para las tres concentraciones de ácido valérico bajo una  $VTO_{máx}$  de 5.8 mmol/L h. Para las tres concentraciones se consumió el 100 % de la sacarosa inicial, a las 72 horas de cultivo, y a las 60 horas para la concentración de 20 mM.

El comportamiento de consumo es similar al reportado por García (2013), en cultivos en matraces agitados de *A. vinelandii* OPNA, medio BS, bajo una  $VTO_{máx}$  de 5.8 mmol/L h, quien al final de su cultivo (60 horas), cuantificó una concentración de sacarosa alrededor de 5 g/L. A pesar de que, en este trabajo la sacarosa se agota por completo a las 72 horas, a las 60 horas para la concentración de 30 y 40 mM, el valor de sacarosa es de 2 g/L.

Si comparamos el comportamiento que sigue la proteína con el comportamiento del consumo de sacarosa, se observa que existe una relación ya que, en el transcurso de las 60 horas a las 72 horas, en la figura 7a se observa que, el crecimiento con base en proteína llega a una fase estacionaria, esto puede ser provocado por la ausencia de sacarosa en el medio.

En la figura 9, se observó que los cultivos para las tres concentraciones de ácido valérico presentaron un perfil de consumo del sustrato similar, es decir, el precursor no es relevante durante el consumo de la fuente de carbono.

En la figura 7b se observa que, a partir de las 60 horas de cultivo, la proteína disminuye, esto puede ser causado por la limitación de sacarosa en el medio (figura 9b). Al no existir una fuente de carbono, el crecimiento celular se detiene.



**Figura 9 Efecto de la concentración del ácido valérico sobre el consumo de sacarosa a una  $VTO_{m\acute{a}x}$  de 5.8 mmol/ L h (a); a una  $VTO_{m\acute{a}x}$  de 12 mmol/ L h (b) y a una  $VTO_{m\acute{a}x}$  de 21 mmol/ L h (c).**

Las velocidades de consumo de sacarosa para las diferentes  $VTO_{m\acute{a}x}$  y para las concentraciones de 20, 30 y 40 mM, se muestran en la tabla 9. Como se puede observar las velocidades de consumo estan relacionadas con la velocidad de transferencia de oxígeno y con la concentración de precursor. Para la  $VTO_{m\acute{a}x}$  de 5.8 mmol/L h y la  $VTO_{m\acute{a}x}$  de 12 mmol/L h, las velocidades de consumo presentan una relación inversa con la concentración de precursor, al existir una menor cantidad de ácido en el cultivo, la velocidad de consumo de sacarosa es ligeramente mayor y viceversa. Ese comportamiento puede ser debido a que *A. vinelandii* prefiere usar ácidos orgánicos en vez de carbohidratos para crecer (Torres, 2020), por lo cual, un menor consumo de sacarosa podría atribuirse a la preferencia de *A. vinelandii* por el ácido valérico presente en el medio.

En el caso del volumen de llenado con 50 mL, correspondiente a una  $VTO_{m\acute{a}x}$  de 5.8 mmol/L h, la sacarosa se agotó entre las 60 y 72 horas (figura 9a); mientras que, en los cultivos con volumen de llenado de 25 mL, es decir, bajo una  $VTO_{m\acute{a}x}$  de 12 mmol/L h, se agotó a partir de las 48 horas (figura 9b). Para la condición de  $VTO_{m\acute{a}x}$  más alta (21 mmol/L h), con un volumen de llenado de 12.5 mL, el consumo de sacarosa fue más rápido, agotándose por completo, para todas las concentraciones de ácido evaluadas, a las 36 horas, como se muestra en la figura 9c.

Estas diferencias en el consumo de la fuente de carbono, son significativas, por lo que es evidente que la velocidad de consumo es mayor en presencia de más oxígeno que cuando se cultiva bajo condiciones de limitación.

**Tabla 9. Tabla comparativa de los rendimientos de biomasa y velocidades de consumo con diferente concentración de precursor bajo distintas VTOs máximas.**

VTO máx 5.8 mmol/ L h		$Y_{x/s}(g g^{-1})$	Velocidad de consumo ( $g_{sacarosa}/ L h$ )
Concentración de ácido valérico (mM)	20	$0.95 \pm 0.10$	$0.277 \pm 0.00$
	30	$0.88 \pm 0.09$	$0.248 \pm 0.01$
	40	$0.97 \pm 0.20$	$0.246 \pm 0.00$
VTO máx 12 mmol/ L h		$Y_{x/s}(g g^{-1})$	Velocidad de consumo ( $g_{sacarosa}/ L h$ )
Concentración de ácido valérico (mM)	20	$0.75 \pm 0.04$	$0.577 \pm 0.06$
	30	$0.78 \pm 0.00$	$0.489 \pm 0.01$
	40	$0.80 \pm 0.05$	$0.379 \pm 0.01$
VTO máx 21 mmol/ L h		$Y_{x/s}(g g^{-1})$	Velocidad de consumo ( $g_{sacarosa}/ L h$ )
Concentración de ácido valérico (mM)	20	$0.54 \pm 0.05$	$0.627 \pm 0.02$
	30	$0.64 \pm 0.07$	$0.548 \pm 0.07$
	40	$0.66 \pm 0.04$	$0.610 \pm 0.01$

## **9.5 Efecto de la concentración de ácido valérico sobre la acumulación de PHAs, a diferentes velocidades de transferencia de oxígeno.**

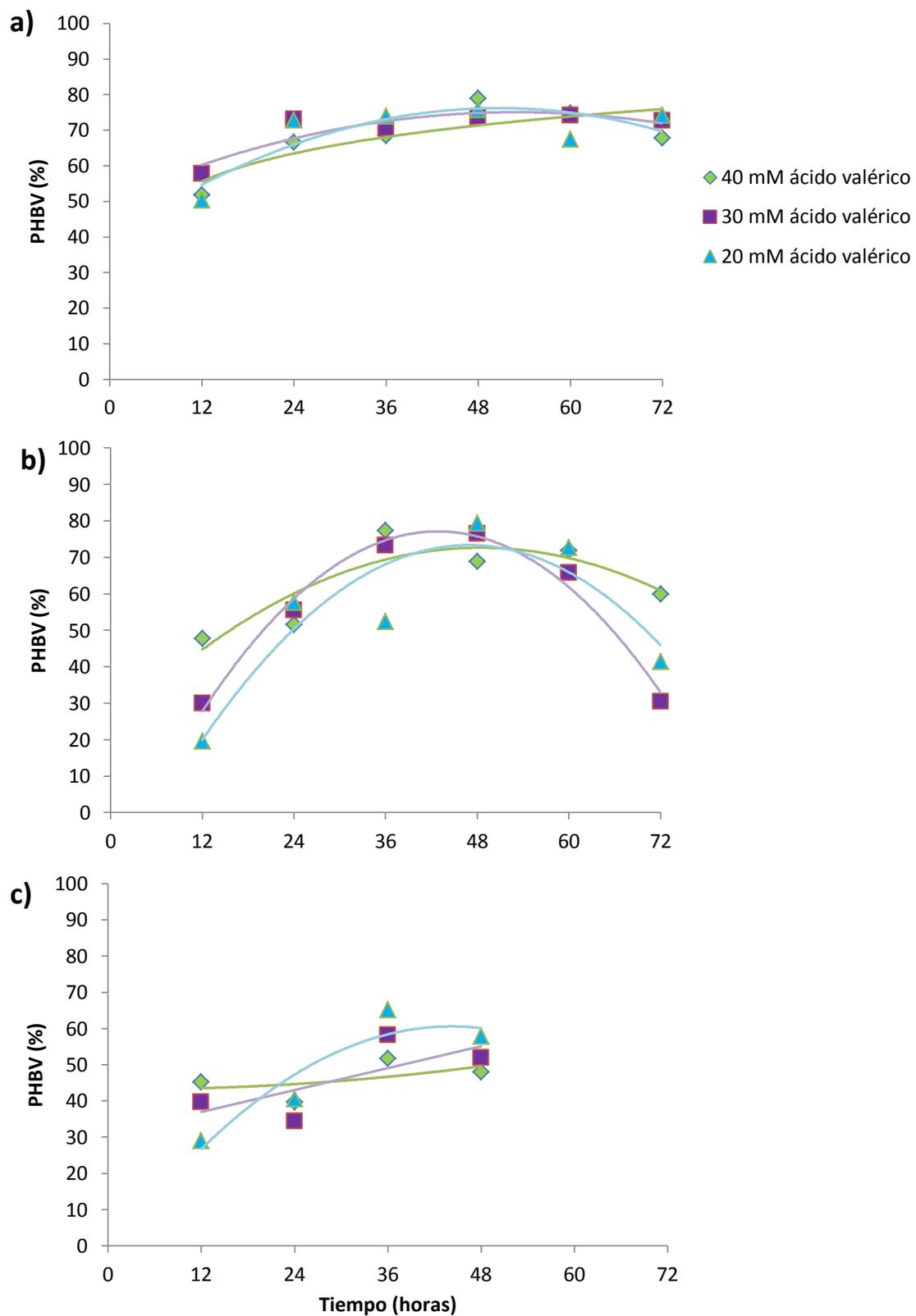
Por otro lado, la acumulación de PHAs resultó significativamente afectada por la velocidad de transferencia de oxígeno máxima. En la figura 10a, se puede notar que el porcentaje de acumulación del copolímero se mantuvo alrededor del 80 % durante todo el cultivo bajo una  $VTO_{m\acute{a}x}$  de 5.8 mmol/L h, también es importante mencionar que no se muestran diferencias significativas que demuestren un efecto de la concentración del ácido valérico sobre la acumulación.

Para esta misma condición de  $VTO_{m\acute{a}x}$  y la adición de ácido valérico en una concentración de 40 mM, Torres *et al.* (2021) observó que, el porcentaje máximo de acumulación de PHAs fue de  $22 \pm 2.4$ , del copolímero PHBV. Este resultado difiere de lo obtenido en este trabajo; sin embargo, se ha reportado por García *et al.* (2014), un máximo porcentaje de acumulación de  $52 \pm 4.7$  % a las 36 horas de cultivo, de P3HB. Cabe resaltar que García *et al.* (2014) empleó medio de cultivo (Burk- sacarosa) a la misma relación C/N 28 que la empleada en este trabajo, y, además, también empleó extracto de levadura, que como ya se mencionó favorece la producción y acumulación del polímero. Por otro lado, se ha descrito que para las cepas de *A. vinelandii* productoras de P3HB, la producción del biopolímero se encuentra asociada al crecimiento (García *et al.*, 2014), y dado que, para estas condiciones el crecimiento, en este trabajo, tuvo valores por encima de los reportados anteriormente, seguramente la acumulación de PHAs está directamente relacionada.

La figura 10b muestra, para la condición de  $VTO_{m\acute{a}x}$  de 12 mmol/L h, un comportamiento diferente, en el cual la acumulación de PHAs evoluciona alcanzando un valor máximo de 80 % entre las 36 y 48 horas, y a partir de ahí, parece haber una degradación del copolímero ya que el porcentaje de acumulación cae hasta valores de 30 % a las 72 horas de cultivo. Es importante resaltar que, el tiempo de cultivo en el que parece haber la degradación del polímero (60 horas), coincide con el agotamiento de sacarosa en el cultivo (figura 9b), por lo que podemos atribuir la degradación de los PHAs, a la ausencia de la fuente de carbono.

En cambio, para la condición de más alta velocidad de transferencia de oxígeno (21 mmol/L h), figura 10c, se puede observar un efecto negativo en la acumulación de PHAs, obteniéndose en promedio valores de hasta 58 % de PHBV. Nuevamente parece ser que la acumulación del copolímero para cada concentración de precursor, sigue la misma tendencia y no se notan cambios significativos al aumentar o disminuir la concentración del ácido valérico.

Para este caso, parece ser que sucede lo mismo que ocurre en la condición de  $VTO_{m\acute{a}x}$  de 12 mmol/L h, a partir de las 36 horas, se logra observar un ligero decremento en el porcentaje de acumulación; y además, en la figura 9c se observa que, a las 36 horas de cultivo la concentración de sacarosa es de 0 g/L. Es decir, cuando se agota la sacarosa, se presenta una degradación del polímero. Lo anterior puede deberse a que, como se sabe, los PHAs son una reserva de carbono y energía, ante la ausencia de la fuente de carbono, *A. vinelandii* utiliza el polímero para su consumo.



**Figura 10** Efecto de la concentración de ácido valérico sobre la acumulación de PHB con una VTO de 5.8 mmol/ L h (a), 12 mmol/ L h (b) y 21 mmol/ L h (c).

## 9.6 Composición del copolímero en función de la concentración del precursor bajo diferentes VTOs.

La figura 11a muestra, los porcentajes de HV alcanzados a las 24 y 48 horas de cultivo, bajo diferentes VTOs, empleando una concentración de precursor de 20 mM se observaron cambios en el porcentaje de HV para las diferentes velocidades de transferencia de oxígeno. Se obtuvieron valores máximos de  $22.62 \pm 0.09$ ,  $36.78 \pm 0.5$  y  $39.2 \pm 1.25$  % de HV en el copolímero PHBV sintetizado, bajo VTOs de 5.8, 12 y 21 mmol/L h, respectivamente.

Como se puede notar, el porcentaje de HV incrementa, bajo condiciones de velocidad de transferencia de oxígeno más altas. Lo que coincide con lo reportado previamente por Urtuvia *et al* (2020), quienes observaron que al incrementar la VTO de 4 a 17 mmol/L h, el porcentaje de HV incrementó de 18.6 a 35, utilizando valerato al 9.8 mM.

La figura 11b, muestra los valores del porcentaje de HV en el PHBV, ahora con una concentración de precursor de 30 mM. Se obtuvieron valores de,  $28.4 \pm 1.4$  y  $21.2 \pm 1.6$  %, a las 24 y 48 horas, respectivamente bajo una  $VTO_{m\acute{a}x}$  de 5.8 mmol/ L h; valores de  $29.1 \pm 0.08$  y  $18.5 \pm 0.63$  %, a las 24 y 48 horas, respectivamente, bajo una  $VTO_{m\acute{a}x}$  de 12 mmol/ L h, y porcentajes de  $43.4 \pm 0.37$  y  $26.5 \pm 0.52$ , a las 24 y 48 horas, respectivamente, bajo una  $VTO_{m\acute{a}x}$  de 21 mmol/ L h. El porcentaje de HV en el copolímero, incrementó utilizando una concentración de ácido valérico de 30 mM, en comparación con la concentración de 20 mM (figura 11a), lo que permite deducir que la concentración del precursor influye en la copolimerización.

La figura 11c, muestra para una concentración de 40 mM de precursor que, se logró obtener 44.28 % de HV a las 24 horas, bajo una  $VTO_{m\acute{a}x}$  de 21 mmol/L h. Para todos los casos los valores más altos de hidroxivalerato, estuvieron presentes en las muestras de 24 horas. Sin embargo, como se muestra en la figura 11, después de ese tiempo el porcentaje de HV en el copolímero empieza a decrecer, este fenómeno puede deberse a que se agota el precursor, aunque aún sigue habiendo síntesis de HV, la cantidad ya es menor. Esto se puede deducir cuando se analiza la figura 11a, se observa que la caída de 3HV a las 48 horas es mayor que la caída que ocurre utilizando una concentración de precursor de 40 mM (figura 11c).

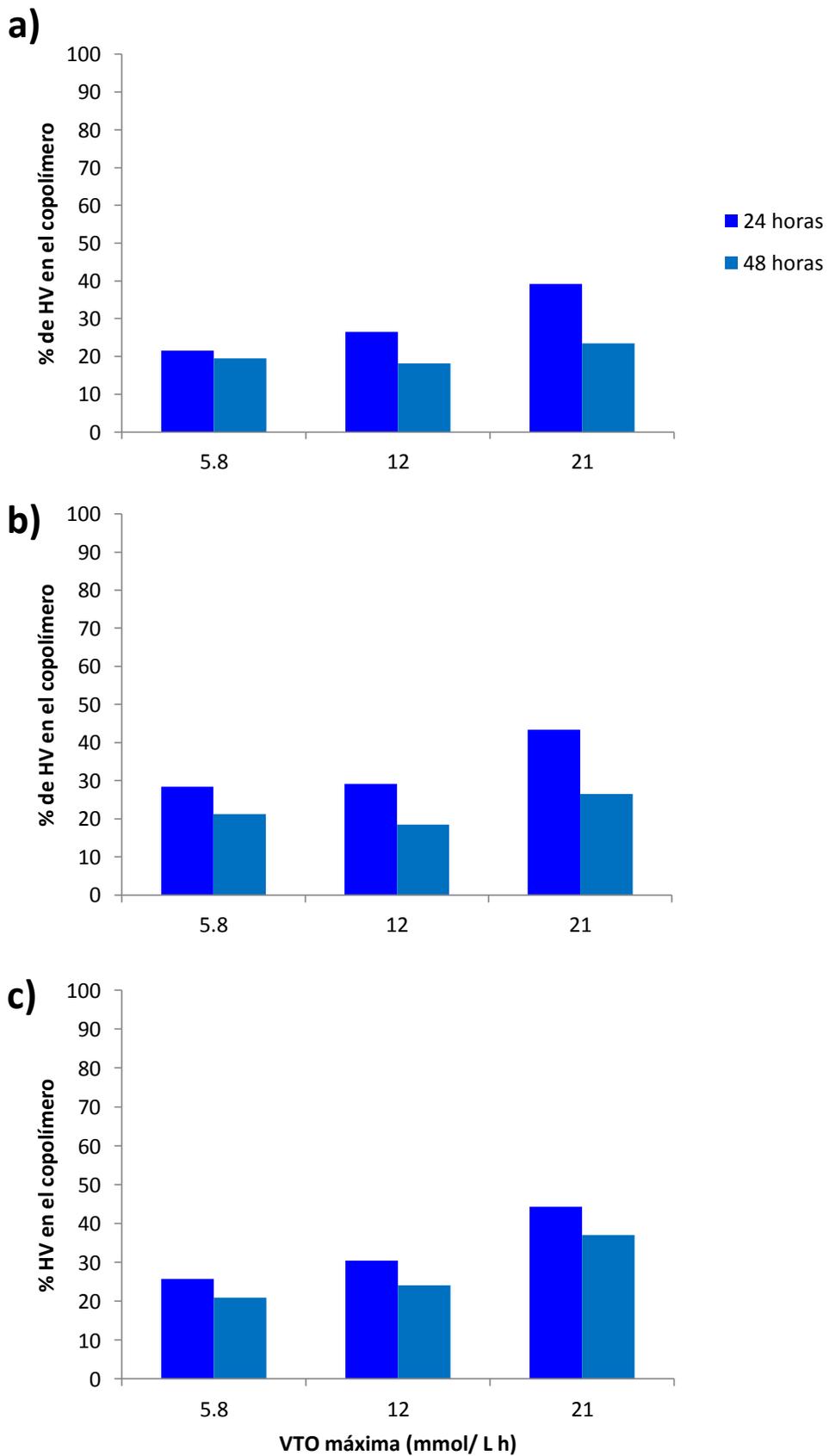
En términos del porcentaje de acumulación del HV, en el copolímero. La condición de VTO más alta experimentada en este trabajo (21 mmol/L h) resultó ser la más favorable, ya que se logró obtener más del 40 %. Cabe mencionar que, dicho valor no ha sido reportado anteriormente. Torres *et al* (2022), reportaron un valor de hasta el 39 % de HV, bajo una VTO de 5.8 mmol/L h y empleando una concentración de ácido valérico de 40 mM, en cultivos en matraces agitados.

Los resultados respecto a la concentración del ácido valérico, concuerdan con los de Torres *et al* (2022), debido a que, al incrementar la concentración de precursor de 10 a 40 mM, el porcentaje de HV en el P (3HB-co-3HV), también incremento de  $8.2 \pm 0.03$  a  $21 \pm 0.5$  % en cultivos realizados en biorreactor, bajo una  $VTO_{m\acute{a}x}$  de 20 mmol/L h.

La tabla 10 muestra que, el porcentaje más alto de HV en el copolímero se alcanza bajo la condición más alta de VTO; sin embargo, la acumulación del copolímero en g/L se ve afectada. Por otro lado, la VTO que permite la acumulación más alta de PHBV es la de 12 mmol/L h, y también permite obtener un copolímero con un  $36.78 \pm 1.89$  % de HV. En resumen, esta es la mejor condición tanto para acumulación y fracción de 3HV.

**Tabla 10. Acumulación del copolímero PHBV y porcentaje de HV en el copolímero bajo diferentes velocidades de transferencia de oxígeno.**

$VTO_{m\acute{a}x}$ ( $mmolL^{-1}h^{-1}$ )	PHBV ( $g L^{-1}$ )	Fracción 3HV (mol %)
5.8	$7.85 \pm 0.1$	$28.37 \pm 1.92$
12	$7.96 \pm 0.3$	$36.78 \pm 1.89$
21	$6.01 \pm 0.84$	$44.28 \pm 1.35$



**Figura 11** Porcentaje de HV en el copolímero PHBV a diferentes VTOs, utilizando concentraciones de ácido valérico de a) 20 mM, b) 30 mM y c) 40 mM.

## 10. CONCLUSIONES

La concentración de ácido valérico no influye significativamente ni en el crecimiento de la cepa OPNA de *A. vinelandii* ni en la acumulación de PHAs.

A diferencia, la  $VTO_{m\acute{a}x}$  del cultivo tiene un efecto positivo sobre el crecimiento de la bacteria y negativo sobre la acumulación de PHAs.

Por otro lado, la degradación del polímero está relacionada con el agotamiento de la fuente de carbono, en este caso, la sacarosa.

El incremento en la  $VTO_{m\acute{a}x}$  y la concentración de ácido valérico favorecen la biosíntesis de un polímero con un alto contenido de HV; sin embargo, afecta negativamente la acumulación de PHAs.

Una  $VTO_{m\acute{a}x}$  de 12 mmol /L h, en combinación con una concentración de 30 mM de ácido valérico, favorece la síntesis de un copolímero con un alto porcentaje de HV (más de 30 %) en su composición y una acumulación cercana al 80 %, con base en el peso seco.

## 11. PERSPECTIVAS

- Es recomendable realizar estudios de las propiedades mecánicas de los copolímeros obtenidos bajo las distintas condiciones, para determinar para que aplicaciones resultarían más convenientes.
- Valdría la pena explorar concentraciones de ácido valérico por encima de 40 mM, dado que una concentración alta de precursor influye positivamente en el porcentaje de HV y no afecta significativamente el crecimiento de *A. vinelandii*.

## 12. REFERENCIAS

- Alzate Maríán, J. C., Caravelli, A. H., & Zaritzky, N. E. (2015). Obtención de plásticos biodegradables por microorganismos acumuladores de polihidroxicanoatos en cultivos mixtos (lodos activados) utilizando efluentes de la industria. In III Jornadas de Investigación, Transferencia y Extensión de la Facultad de Ingeniería.
- Anderson, AJ y Dawes, E. (1990). Ocurrencia, metabolismo, papel metabólico y usos industriales de polihidroxicanoatos bacterianos. *Revisiones microbiológicas*, 54 (4), 450-472.
- Babel, W., & Steinbüchel, A. (2001). Biopolyesters. Special issue of advances in Biochemistry. *Engineering. Biotechnology*, 1, 342.
- Barbosa, M., Hernández, A. E., Romero, D. M., & Sarmiento, N. M. (2005). Producción de poli-B-hidroxitirato (PHB) por *Ralstonia eutropha* ATCC 17697. *Universitas Scientiarum*, 10(1), 45-54
- Clementi, Francesca, *et al.* "Optimal conditions for alginate production by *Azotobacter vinelandii*." *Enzyme and Microbial Technology* 17.11 (1995): 983-988.
- Delgado, A. C. L., & Cordoba, A. M. (2015). Polihidroxicanoatos (PHA's) producidos por bacterias y su posible aplicación a nivel industrial. *Informador técnico*, 79(1), 93-101.
- Díaz - Barrera, A., Andler, R., Martínez, I. y Peña, C. (2016). Producción de poli - 3 - hidroxitirato por cepas de *Azotobacter vinelandii* en cultivos por lotes a diferentes velocidades de transferencia de oxígeno. *Revista de tecnología química y biotecnología*, 91 (4), 1063-1071.
- García, A., Pérez, D., Castro, M., Urtuvia, V., Castillo, T., Díaz-Barrera, A., ... & Peña, C. (2019). Production and recovery of poly-3-hydroxybutyrate [P (3HB)] of ultra-high molecular weight using fed-batch cultures of *Azotobacter vinelandii* OPNA strain. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 94(6), 1853-1860.

- García, Y. G., Contreras, J. C. M., Reynoso, O. G., & López, J. A. C. (2013). Síntesis y biodegradación de polihidroxicanoatos: plásticos de origen microbiano. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 29(1), 77-115.
- Gómez-Pazarín, K., Flores, C., Castillo, T., Büchs, J., Galindo, E., & Peña, C. (2016). Molecular weight and viscosifying power of alginates produced in *Azotobacter vinelandii* cultures in shake flasks under low power input. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 91(5), 1485-1492.
- Klimek, J., & Ollis, D. F. (1980). Extracellular microbial polysaccharides: kinetics of *Pseudomonas sp.*, *Azotobacter vinelandii*, and *Aureobasidium pullulans* batch fermentations. *Biotechnology and Bioengineering*, 22(11), 2321-2342.
- Loo, C. Y., & Sudesh, K. (2007). Polyhydroxyalkanoates: bio-based microbial plastics and their properties. *Malaysian Polymer Journal*, 2(2), 31-57.
- Maier, U., & Büchs, J. (2001). Characterisation of the gas-liquid mass transfer in shaking bioreactors. *Biochemical Engineering Journal*, 7(2), 99-106.
- Noguez, R., Segura, D., Moreno, S., Hernandez, A., Juarez, K., & Espín, G. (2008). Enzyme INtr, NPr and IANtr are involved in regulation of the poly- $\beta$ -hydroxybutyrate biosynthetic genes in *Azotobacter vinelandii*. *Microbial Physiology*, 15(4), 244-254.
- Padilla-Córdova, C., Mongili, B., Contreras, P., Fino, D., Tommasi, T., & Díaz-Barrera, A. (2020). Productivity and scale-up of poly (3-hydroxybutyrate) production under different oxygen transfer conditions in cultures of *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 95(11), 3034-3040.
- Page, W. J., Manchak, J. A. N. E. T., & Rudy, B. R. E. N. T. (1992). Formation of poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) by *Azotobacter vinelandii* UWD. *Applied and environmental microbiology*, 58(9), 2866-2873.
- Peña, C., Castillo, T., Núñez, C., & Segura, D. (2011). Bioprocess design: fermentation strategies for improving the production of alginate and poly- $\beta$ -hydroxyalkanoates (PHAs) by *Azotobacter vinelandii*. Rijeka, Croatia: INTECH-Open Access Publisher, 217-242.
- Peña, C., Hernández, L., & Galindo, E. (2006). Manipulation of the acetylation degree of *Azotobacter vinelandii* alginate by supplementing the culture medium

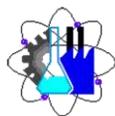
with 3-(N-morpholino)-propane-sulfonic acid. Letters in applied microbiology, 43(2), 200-204.

- Peña, C., Reyes, C., Larralde-Corona, P., Corkidi, G., & Galindo, E. (2002). Characterization of *Azotobacter vinelandii* aggregation in submerged culture by digital image analysis. FEMS microbiology letters, 207(2), 173-177.
- Recimex. (2022). Precios de plásticos reciclados – Agosto 2017. <https://www.recimex.com.mx/blog/?p=506>
- Rocha, R. C., da Silva, L. F., Taciro, M. K., & Pradella, J. G. (2008). Production of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) P (3HB-co-3HV) with a broad range of 3HV content at high yields by Burkholderia sacchari IPT 189. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 24(3), 427-431.
- Rivera-Briso, A. L., & Serrano-Aroca, Á. (2018). Poly (3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate): Enhancement strategies for advanced applications. Polymers, 10(7), 732.
- Sadoff, H. L. (1975). Encystment and germination in *Azotobacter vinelandii*. Bacteriological reviews, 39(4), 516-539.
- Sanguino, E. (2018). Producción de poli-β- hidroxibutirato (PHB) en cultivos alimentados utilizando la cepa mutante *Azotobacter vinelandii* OPNA.
- Salehizadeh H, Van Loosdrecht MC. Production of polyhydroxyalkanoates by mixed culture: recent trends and biotechnological importance. Biotechnol Adv.
- Segura, D., Guzmán, J., & Espín, G. (2003). *Azotobacter vinelandii* mutants that overproduce poly-β-hydroxybutyrate or alginate. Applied microbiology and biotechnology, 63(2), 159-163.
- Segura, D., Noguez, R., & Espín, G. (2007). Contaminación ambiental y bacterias productoras de plásticos biodegradables. Biotecnología, 14(3), 361-372.
- Urtuvia, V., Maturana, N., Peña, C., & Díaz-Barrera, A. (2020). Accumulation of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Azotobacter vinelandii* with different 3HV fraction in shake flasks and bioreactor. Bioprocess and biosystems engineering, 43(8), 1469-1478.
- Vaishnav, A. (2021). Microbial Polymers: Applications and Ecological Perspectives. Springer Nature.

- Xu, Zhongshuo, *et al.* "El sistema de desnitrificación con soporte de polímeros PHBV trató eficientemente las aguas residuales con alta concentración de nitrato: rendimiento de la desnitrificación, evolución de la estructura de la comunidad microbiana y bacterias desnitrificantes clave". *Chemosphere* 197 (2018): 96-104.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



Facultad de Ciencias  
Químicas e Ingeniería



## FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS e INGENIERÍA

Programas educativos de calidad reconocidos por CIEES, CACEI y CONACYT  
SGC Certificada en la norma ISO 9001:2015

FORMA T4A  
NOMBRAMIENTO COMITÉ REVISOR

Cuernavaca, Mor., a 11 de octubre de 2022

**DR. HORACIO MARTÍNEZ VALENCIA**  
**MTRO. DANIEL MORALES GUZMÁN**  
**DR. CARLOS FELIPE PEÑA MALACARA**  
**DR. ROBERTO FLORES VELÁZQUEZ**  
**DR. ANDRÉS GARCÍA ROMERO**  
**P R E S E N T E**

Me permito comunicarles que han sido designados integrantes del **COMITÉ REVISOR** del trabajo de: **TESIS**  
Titulado: **Evaluación de la velocidad de transferencia de oxígeno y concentración del ácido valérico en matraces agitados sobre la composición monomérica del copolímero P(3HB-co-3HV) producido por la cepa modificada de Azotobacter vinelandii OPNA.**

Que presenta (el) o (la) **C. PAOLA IVETH CRUZ NORIEGA.** De la **LICENCIATURA en INGENIERÍA QUÍMICA**

**A T E N T A M E N T E**  
*Por una humanidad culta*

**DRA. VIRIDIANA AYDEÉ LEÓN HERNÁNDEZ**  
**DIRECTORA**

**Se anexa firma electrónica**

### D I C T A M E N

**DRA. VIRIDIANA AYDEÉ LEÓN HERNÁNDEZ**  
**DIRECTORA DE LA FCQel**  
**P R E S E N T E**

En respuesta a su amable solicitud para emitir DICTÁMEN sobre el trabajo que se menciona, me permito informarle que nuestro voto es:

VOTO	NOMBRE	FIRMA
	<b>DR. HORACIO MARTÍNEZ VALENCIA</b>	
	<b>MTRO. DANIEL MORALES GUZMÁN</b>	
	<b>DR. CARLOS FELIPE PEÑA MALACARA</b>	
	<b>DR. ROBERTO FLORES VELÁZQUEZ</b>	
	<b>DR. ANDRÉS GARCÍA ROMERO</b>	

**El voto del comité es aprobatorio, se anexan firmas electrónicas**

VALH/fmg

Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México, 62209  
Tel. (777) 329 70,00, Ext. 7039/ fcqei@uaem.mx





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**VIRIDIANA AYDEE LEON HERNANDEZ** | Fecha:2022-10-13 21:18:41 | Firmante

hYWF/o3/ePTKli4M8yZuJ2Jt06kWsK3aCwx89Ew9AGZUbsgVaU6KgiEzmj61abv0j2PQl4nAQd9j3WAK756xVOLrpi/W/4qXkldbDWjTk5E1WraJBIBhkiNjFeHqWWC1u0IKWbZU  
O0uuRF97Qxvhpo+Wj4F+YTwDy+lockRqRDVcLgo0gm7xymISGFSkJP/kQE+sl5MSp3NxmAbtAOutFicw0s47Gz3t5OpCi1Z6nVt9kcT9qW4PW/A8jsm6McR8QqrhuSa6E1aP1W  
cVQRc8lKS8pNu4AYP7qqGFYGEmr9y7H4FVSqNCB6BgJ4A6/eTuLCTZqb4UMaoW+WTp6ABfw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[uvt8JD2N0](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/LbyEd6EKxY8KOoRuFcCdXPITv4nAFqh2>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

CARLOS FELIPE PEÑA MALACARA | Fecha:2022-10-14 12:18:30 | Firmante

H41tQ3l0X4fHcLFIPVBo1WmkenIM4XtjAFQnLSVHZfQab1KFdjSTKYkOGFKXt219CbXOoUJoHY2GWMtOubwMnlevEV8VR0x/maeiND6QTBie7hWMydliQVDok/9OuOnNSoAOfq2jnqBEoDHMDMVEsgY5sUvQta4uMkXVjiOQY3YY1STStL2dF6mokj9koQokAqdFyF2LYv0XkoFbQZ8nmKRTP+K5v93+sb8jWBn+886euaoBro9JrRnTsAW8/fBmsnfa1b+ImI8QCikA6/1FiNaZdI9Ziy3hvRzG00mHYiik2SiIRXmVdoQ9nQeernPlzQP3EYThMBA39qmTfkww==

ANDRES GARCIA ROMERO | Fecha:2022-10-14 12:42:44 | Firmante

j4rvmjyEegg7BEP3k3fUQzUsD56oqrsfi7Qr7nizLNhZncEp+UcVjx1YybrB71LtgWf5iAfkBWnDJHpKQyum2orXWV0hSmhu2IkC6rDJ6tmXkmJZe7rSMNXcmFmdAj9uGy+bHzUE2khryXyEuDr1Rc5x9HKkC7uab+nMqW++CO2a8ZNRYaAy+36bGMEAwmhQRLLVPnmIIGTRjwIRKM/+APDnbo5vIo7FavDP4m+isSge/EMHdYCC7JqtNEgmK2cJktdzM1dTvaMwXMqpX9OUXOcyiHTIkZSs6xOO0GjYnK1AGOQCqo2b8fX4uJ/jtGiq5VuSjIUIl/q3REIz00XFQ==

HORACIO MARTINEZ VALENCIA | Fecha:2022-10-14 13:39:27 | Firmante

EuxCEEZyxkCedSf7z9pl5GL2h3GzMIbtCQRShZcB0npQ/s95r7mV2q67YwS6eMOSHsygN7T3skMsYXuPkCJp7IMwzflsmVlwOEjRn+qdrd813spLSRJUpyrqfMmaswtBzFlzRFtm/umJH9TBNK230CQmfxUoJjXlic+u32sLvoOixEKSlahHCTLvyeKh+cvRDK/BEEmMZTfN4gXexvh17zz4LqgpNkC0w06r8jxsvPNB7zN+cm/H19OXGxqBULKQAluxxYIHtCJWIEsT2zALJdRtLbKf8Yz54g0UIKilvHWCMDejxP61nC70qTzya9nhmZMZrTzVzVfL/GMO3CIA==

DANIEL MORALES GUZMAN | Fecha:2022-10-18 13:12:05 | Firmante

gn1rsU8ikRQm5ogMSU2om05icDhtC55iXxznzSWn0YBMIPcYC830v0MONu/qbgFS9tLJjhXO7rpsH60IUI+xGRV6JaDYg/1eSNb+Y5/ZJPihNNN1qbdPW9+OfdBZCbaYo7sXYkOqxCMo7o22XjTC9CvjkZzX1puAs4QeZB40GTU8y7tu6knrbQUYA0KQg1A1S4tLJNT6WVwVe3MfzlpLiPEhvasqeSs6t908peGYGngptng8TgGzThHoVH1YULdBwTp/PuBC6tiavxn5OINJrurisWPAuLuZ3jsrCwPfbEQ8Y76JtgDu2PaTUJfi12sARWcUVEchdeTbXqIQ==

ROBERTO FLORES VELAZQUEZ | Fecha:2022-10-19 21:55:26 | Firmante

CZ0lyf8h+yQpKfBUfqqUdjy/i7dBpL/OlwMQvspNKilQzD+fzVrXecVkv/1a2swTVs7j4R3hcH/TeQvMgC75lw9cr8U/pnXOS55YbplcUONM0PgTgiLJFFQ9iQ0pm8Z1mMyocZzCs m5enRqbobalo2jjUf4B/gc8XyGMn5ivDzYFumEuR/IG9JdTK0gkoEdkZgaZgP7k0f/MbL2iMJG5OxNxs7aNZfc85Ko+5YIMLIsU2VNZDp6H1uLEFg1BH+70r4bMFY7dBnu6RbSvV1Lb0VQIoU/2ZATYmI6+UNjuUXPnQ7gJ7P+4bHQEWR/CzoeZcXtBj3l+7lX8cjuMk6IA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



54N362LcK

https://efirma.uaem.mx/noRepudio/dAuhKXTwsDQ3guCCV11xUg6Uen3euCj

