



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Facultad de Ciencias
Químicas e Ingeniería

Universidad Autónoma del Estado de Morelos

Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería

Caracterización de la producción de alginato en las cepas de *Azotobacter vinelandii* OP AlgU+ y GG9, bajo diferentes condiciones de transferencia de oxígeno

TESIS

Que para obtener el título de:
Químico Industrial

Presenta:
Diego Ramos Peralta

Director de tesis:
Dra. Tania Castillo Marengo, IBT UNAM.

Asesor interno:
Ing. Víctor Manuel Nogueira Cardín, UAEM

Cuernavaca, Morelos.

Septiembre, 2020

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 dirección de la Dra. Tania Castillo Marengo, en el grupo del Dr. Carlos F. Peña Malacara.

Durante la realización del mismo se contó con el financiamiento del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM, a través de los proyectos PAPIIT-UNAM IT-200216 y PAPIIT-UNAM-AG200219, así mismo con el proyecto CONACYT-FONCICYT 277600 DGAPA-UNAM.

Dedicatorias

A mi madre: **Ana Luisa Peralta Barranco**, por haber sido la persona más maravillosa de mi vida, que gracias a ella estoy donde estoy y soy lo que soy. Cada día se preocupó por mí, dándome todo y más de lo que yo merecía, pero siempre ella estaba ahí, alentándome a seguir adelante.

Las personas nunca mueren si se llevan en el corazón.

GRACIAS ma.

A mis hermanas: **Yuquenci, Laura, Rocio y Jazmin**, por estar en los momentos más difíciles de mi vida, y por el total apoyo que me han brindado en los últimos años. Por preocuparse por mí en lo académico y personal, por ser guías de mi vida, y que no existen las palabras suficientes de agradecimiento que les tengo a ellas.

Muchas gracias.

A mi **familia**, por el apoyo y seguimiento que tuvieron conmigo durante mi carrera.

Gracias.

Agradecimientos

A mi tutora la **Dra. Tania Castillo Marengo** por sus preocupaciones, consejos y sugerencias para el proyecto. Sin su ayuda este trabajo no hubiera salido adelante y gracias a ella mejoré como profesionista y como persona, agradezco la confianza que puso sobre mí y el apoyo que me brindo durante todo este tiempo.
Muchas gracias Dra.

Al **Dr. Carlos Peña**, por darme la oportunidad de pertenecer a su grupo de investigación, por las correcciones, sugerencias y apoyo durante la realización del proyecto.
Gracias.

Al **Dr. Enrique Galindo Fentanes**, por la oportunidad de pertenecer a su grupo de investigación.

A la **Dra Celia**, por su apoyo técnico, **Abraham** por su ayuda con el equipo de potencia, a **Nayeli** y **Sergio**, por ayudarme con el uso del Reómetro.
A todos mis compañeros del laboratorio, **Andres, Elsa, Jorge, Johana, Daniel, Clara, Ivet, Paola** y **Tomas** por su amistad y por tener un buen ambiente en el laboratorio.
Gracias.

Índice

ÍNDICE DE FIGURAS	3
ÍNDICE DE TABLAS	5
NOMENCLATURA	6
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
3. ANTECEDENTES	5
3.1 Matracas agitados en el campo de la biotecnología.....	5
3.2 Transferencia de oxígeno en matraces agitados.....	5
3.3 Consumo de potencia en matraces agitados.....	6
3.3.1 Fenómeno “ fuera de fase” en matraces agitados.....	7
3.4 Características y aplicaciones del alginato	8
3.5 <i>Azotobacter vinelandii</i> como modelo de producción de alginato	10
3.6 Metabolismo y biosíntesis del alginato en <i>A. vinelandii</i>	11
3.7 Regulación de la biosíntesis del alginato	12
3.8 Estrategias de cultivo que afectan la producción y las propiedades químicas del alginato producido por <i>A. vinelandii</i>	13
3.9 Efecto de la velocidad de transferencia de oxígeno	13
3.10 Modificaciones genéticas en <i>A. vinelandii</i>	13
3.10.1 <i>A. vinelandii</i> OP AlgU+	14
3.10.2 <i>A. vinelandii</i> GG9	14
4. OBJETIVOS	15
4.1 Objetivo general.....	15
4.2 Objetivos específicos.....	15
5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	16
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
6.1 Cepas	18
6.2 Preservación de las cepas	18
6.3 MEDIO DE CULTIVO	18
6.4 Desarrollo de los cultivos	19
6.4.1 Preparación del pre-inóculo.....	19
6.4.2 Preparación del inóculo.....	19
6.4.3 Cultivo en matraces agitados	20

6.5	Determinación de la VTO	20
6.6	Determinación de la potencia volumétrica.....	21
6.7	Métodos analíticos (fuera de línea)	23
6.7.1	Determinación de biomasa total.....	23
6.7.2	Cuantificación de alginato.....	23
6.7.3	Determinación de sacarosa.....	23
6.7.4	Determinación de proteína	25
6.7.5	Determinación de la viscosidad del caldo de cultivo y capacidad viscosificante.....	26
6.7.6	Determinación del peso molecular del alginato	27
6.8	Cálculo de los parámetros cinéticos.....	28
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
7.1	Velocidad de transferencia de oxígeno.....	30
7.2	Consumo de potencia	32
7.3	Análisis reológico del caldo de cultivo y capacidad viscosificante del alginato de las cepas de <i>A. vinelandii</i> ATCC9046, OP AlgU+ y GG9.....	34
7.4	Análisis de la producción y del peso molecular del alginato producido por las cepas de <i>A. vinelandii</i> ATCC9046, OP AlgU+ y GG9.....	37
7.5	Cinéticas de crecimiento y consumo de sustrato de las cepas de <i>A. vinelandii</i> ATCC9046, OP AlgU+ y GG9.	44
8.	CONCLUSIONES	48
9.	REFERENCIAS.....	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1. Conformación y composición del alginato, donde M es el ácido β -D-manurónico, G es igual α -L-gulurónico, y Ac es un grupo acetilo (López, 2018).....	8
Figura 3.2. Ruta de biosíntesis del alginato en <i>A. vinelandii</i> (Castillo, 2013. López, 2018).....	12
Figura 5.1. Esquema de la estrategia experimental utilizada en este trabajo.....	17
Figura 6.1. Equipo RAMOS, A) Plataforma de agitación, B) Matraz de 250 mL con entrada y salida de gases, C) Sensor galvánico, D) Regulador de temperatura y E) Unidad de control.....	21
Figura 6.2. Equipo para medir el consumo de potencia volumétrica en matraces, A) Control de temperatura, B) Plataforma de agitación, C) Control de agitación, D) Sensor de torque.....	22
Figura 6.3. Curva patrón para la determinación de sacarosa.....	25
Figura 6.4. Curva patrón para la determinación de proteína.....	26
Figura 7.1. Evolución de la velocidad de transferencia de oxígeno en las cepas de <i>A. vinelandii</i> ATCC9046, OP AlgU+ y GG9. a) Alta transferencia b) baja transferencia.....	31
Figura 7.2. Evolución del consumo de potencia en las cepas de <i>A. vinelandii</i> ATCC9046, OP AlgU+ y GG9. a) alta transferencia, b) baja transferencia.....	33
Figura 7.3. Viscosidad aparente del caldo de cultivo en las cepas de <i>A. vinelandii</i> ATCC9046, OP AlgU+ y GG9. a) alta transferencia, b) baja transferencia. A una velocidad de corte igual a 300 s^{-1}	35
Figura 7.4. Capacidad viscosificante del alginato producido por las cepas de <i>A. vinelandii</i> ATCC9046, OP AlgU+ y GG9. a) alta transferencia, b) baja transferencia.....	37

Figura 7.5: Producción de alginato en los caldos de cultivo de las cepas de <i>A. vinelandii</i> ATCC9046, OP AlgU+ y GG9. a) alta transferencia, b) baja transferencia.	38
Figura 7.6: Evolución del peso molecular del alginato producido por las cepas de <i>A. vinelandii</i> ATCC9046, OP AlgU+ y GG9. a) alta transferencia. b) baja transferencia.	40
Figura 7.7: Distribución del peso molecular del alginato a las 72 horas producido por las cepas de <i>A. vinelandii</i> ATCC9046, OP AlgU+ y GG9. a) alta transferencia, b) baja transferencia.	42
Figura 7.8. Cinética de crecimiento de las cepas de <i>A. vinelandii</i> ATCC9046, OP AlgU+ y GG9. a) alta transferencia, b) baja transferencia.	45
Figura 7.9. Consumo de sacarosa de las cepas de <i>A. vinelandii</i> ATCC9046, OP AlgU+ y GG9. a) alta transferencia, b) baja transferencia.	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1. Aplicaciones de los alginatos	10
Tabla 6.1. Cepas utilizadas en este trabajo.....	18
Tabla 6.2. Antibióticos utilizados para la preservación de las cepas de <i>A. vinelandii</i>	18
Tabla 6.3. Composición del medio Burk-sacarosa con extracto de levadura	19
Tabla 7.1. Resumen de datos de productividad, concentración máxima de alginato y PMP máximo de las cepas de <i>A. vinelandii</i> ATCC9046, OP AlgU+ y GG9, en alta (AT) y baja (BT) transferencia.....	43
Tabla 7.2. Tabla comparativa de los parámetros cinéticos de las cepas de <i>A.</i> <i>vinelandii</i> ATCC9046, OP AlgU+ y GG9 en alta transferencia.	47
Tabla 7.3. Tabla comparativa de los parámetros cinéticos de las cepas de <i>A.</i> <i>vinelandii</i> ATCC9046, OP AlgU+ y GG9 en baja transferencia.	47

NOMENCLATURA

A	Área (m^2)
a	Área específica
CV	Capacidad viscosificante ($L\ g^{-1}$)
d	Diámetro interno máximo de matraz (m)
d_o	Diámetro de agitación (m)
K	Índice de consistencia de flujo ($Pa \cdot s^m$)
q_{Alg}	Productividad volumétrica del alginato ($g\ L^{-1}\ h^{-1}$)
K_L	Coefficiente de transferencia de masa
L_{O_2}	Solubilidad del oxígeno ($mol\ L^{-1}\ bar^{-1}$)
m	Índice de comportamiento de flujo (-)
M	Torque (N. cm)
n	Frecuencia de agitación (s^{-1})
n_{O_2}	Moles de oxígeno (mol)
Ne'	Número modificado de Newton (-)
P	Potencia mecánica (W)
Ph	Número de fase (-)
P_{O_2}	Presión parcial del oxígeno (Pa)
PMP	Peso molecular promedio (kDa)
R	Constante de los gases ($bar\ L\ mol^{-1}\ K^{-1}$)
S	Concentración de sustrato ($g\ L^{-1}$)
t	Tiempo de cultivo (h)
T	Temperatura (K)
V_L	Volumen de llenado (m^3)
VTO	Velocidad de transferencia de oxígeno ($mmol\ L^{-1}h^{-1}$)
X	Concentración de biomasa (gL^{-1})
$Y_{Alg/X}$	Rendimiento de producto con base en biomasa ($g_p\ g_s^{-1}$)

$Y_{x/s}$	Rendimiento de biomasa con base en sacarosa ($g_B g_s^{-1}$)
$\dot{\gamma}$	Velocidad de corte (s^{-1})
μ	Velocidad específica de crecimiento (h^{-1})
η	Viscosidad aparente (mPa s)
ρ	Densidad ($kg m^{-3}$)

1. RESUMEN

El alginato es un polisacárido que tiene la capacidad de formar geles e incrementar la viscosidad en soluciones, por lo que tiene una amplia gama de aplicaciones en diversos sectores industriales. Así mismo, ha sido un modelo de estudio en el escalamiento de fermentaciones microbianas, que producen soluciones viscosas.

El objetivo general de este proyecto fue caracterizar la producción de alginato, así como, la capacidad viscosificante de los caldos de cultivo y la potencia volumétrica en los cultivos de cepas modificadas genéticamente de *Azotobacter vinelandii*, bajo dos condiciones de velocidad de transferencia de oxígeno.

Se caracterizaron las cepas de *A. vinelandii* OP AlgU+, GG9 y la cepa ATCC9046 como cepa control. Los cultivos se llevaron a cabo en matraces agitados de 250 mL, la condición de alta transferencia se obtuvo con un volumen de llenado de 50 mL a 200 rpm y la condición de baja transferencia se obtuvo con un volumen de llenado de 100 mL a 150 rpm.

En relación con el consumo de potencia volumétrica, en la condición de alta transferencia para las tres cepas de *A. vinelandii* ATCC9046, OP AlgU+ y GG9, se obtuvieron consumos de potencia máximos de entre 1 y 1.2 kWm⁻³. En contraste en la condición de baja transferencia, para los cultivos de las tres cepas, los consumos de potencia máximos fueron de 0.2 a 0.4 kWm⁻³.

Para los cultivos de las tres cepas de *A. vinelandii* ATCC9046, OP AlgU+ y GG9, bajo las dos velocidades de transferencia de oxígeno evaluadas, se obtuvieron concentraciones de alginato similares aproximadamente entre 3 y 4 g L⁻¹. Con respecto al peso molecular del alginato sintetizado en la condición de alta transferencia en los cultivos de las tres cepas presentaron pesos moleculares mayores a los 2000 kDa. Sin embargo, en la condición de baja transferencia las cepas de *A. vinelandii* OP AlgU+ y GG9, presentaron una disminución de los pesos moleculares, alcanzando valores de 467 ± 12 kDa y 656 ± 22 kDa, respectivamente. Sin embargo, en los cultivos de la cepa control (ATCC9046) en la condición de baja transferencia se obtuvieron alginatos con un peso molecular promedio de 2535 ± 60 kDa.

Las viscosidades aparentes de los caldos de cultivo, en la condición de alta transferencia para las cepas OP AlgU+ y GG9, fueron de 23 mPa.s y 25 mPa.s respectivamente, mientras que en los cultivos de la cepa silvestre (ATCC9046) se alcanzó una viscosidad aparente de 30 mPa.s. Sin embargo, en la condición de baja transferencia la viscosidad en los caldos de cultivo de las cepas mutantes, disminuyó, alcanzando valores de 10 mPa.s y 5 mPa.s, para los cultivos de las cepas OP AlgU+ y GG9, respectivamente. Mientras que, para la cepa silvestre la viscosidad aparente fue de 23 mPa.s.

2. INTRODUCCIÓN

Los matraces agitados son uno de los biorreactores más utilizados en el campo de la biotecnología y en la bioindustria, se han utilizado para la evaluación de materias primas, condiciones de cultivo, evaluación de nuevas cepas y establecimiento de métodos analíticos (Büchs, 2001). Debido a la gran variedad de información que nos brindan el uso de matraces agitados, se ha empleado como la base para el escalamiento de un bioproceso.

Los parámetros que afectan el uso de matraces agitados son: las características del matraz (tamaño, forma y material del que este hecho) y de los parámetros operacionales: volumen de llenado, velocidad y diámetro de agitación (Büchs, 2001).

Se ha logrado medir la velocidad de transferencia de oxígeno (VTO) y el consumo de potencia en este tipo de biorreactores, que son parámetros que nos ayudan a caracterizar cultivos microbianos, y nos brindan información sobre el estado fisiológico del microorganismo (Anderlei & Büchs, 2001; Büchs et al., 2001).

La VTO y el consumo de potencia se ven afectados por los parámetros operacionales del cultivo (velocidad de agitación, volumen de llenado y diámetro de agitación), pero también se ha reportado que cambios en la reología del medio, como cambios en la viscosidad, tienen un impacto directo sobre estos parámetros (Giese et al., 2014; Maier & Büchs, 2001).

Azotobacter vinelandii es una eubacteria de vida libre, no patógena, capaz de fijar nitrógeno atmosférico, además de que produce dos polímeros, el polihidroxitirato (PHB) y el alginato. El alginato es un polímero conformado por el ácido β -D-manurónico y su epímero el ácido α -L-gulurónico, que se encuentran en diversas proporciones a lo largo de la cadena lineal, además puede presentar (en bacterias) grupos acetilo (Galindo et al., 2007). El alginato presenta características reológicas de interés, de las cuales las más importantes son la capacidad viscosificante y la formación de geles (Flores et al., 2014), y es por estas características que los alginatos tienen aplicación en diversas industrias, como la alimentaria, farmacéutica y médica. Cabe mencionar, que la producción del polímero ha sido un modelo de estudio para la producción de caldos viscosos en el desarrollo y escalamiento de bioprocesos.

La capacidad del alginato para inducir viscosidad, depende de su composición química: peso molecular, la proporción de los monómeros (G/M) y del grado de acetilación. Se han implementado estrategias de cultivo para la manipulación de las características químicas del alginato, como es el peso molecular. En estudios previos se ha observado que la limitación de oxígeno (baja velocidad de transferencia de oxígeno) tiene un efecto positivo sobre el peso molecular del alginato (Díaz-Barrera et al., 2007; Peña et al., 2011). En estos estudios, se han reportado alginatos con pesos moleculares promedio de hasta 2000 kDa (Gómez-Pazarín et al., 2015), en cultivos desarrollados a velocidades de transferencia de oxígeno menores a $6 \text{ mmolL}^{-1}\text{h}^{-1}$, además se ha observado que hay un aumento en el grado de acetilación, dando como resultado caldos más viscosos. En el trabajo de Peña et al., (2006), se reportó un aumento en el grado de acetilación, añadiendo una mayor concentración de ácido 3-(N-morfolino) propano sulfónico (MOPS).

Otra estrategia para obtener mayor producción de alginatos de alto peso molecular y por ende caldos más viscosos, es el diseño de cepas mutantes, para que presenten fenotipos de sobreproducción de alginato o de un polímero de alto peso molecular (Noar & Bruno-Bárcena, 2018). Ejemplos de estas cepas mutantes son: *A. vinelandii* AT6, que tiene una mutación en el gen *phbB*, en la cual se afectó negativamente la síntesis de PHB, lo cual se reflejó en un incremento en la producción de alginato de hasta cuatro veces con respecto a su cepa parental (Segura et al., 2003). *A. vinelandii* SML2, que tiene una mutación en alginato liasas, que son las encargadas de degradar el polímero, dando como resultado alginato de alto peso molecular (Trujillo-Roldán et al., 2003), así mismo se han eliminado proteínas que regulan negativamente la producción de alginato como en la cepa *A. vinelandii* GG9 (Ahumada-Manuel et al., 2017) o se ha insertado genes que regulan positivamente la biosíntesis de alginato, como en la cepa *A. vinelandii* OP AlgU+.

Por lo que, el objetivo de este proyecto fue caracterizar la producción de alginato de cepas mutantes de *A. vinelandii* en dos velocidades de transferencia de oxígeno.

3. ANTECEDENTES

3.1 Matraces agitadas en el campo de la biotecnología.

Los matraces agitados han sido uno de los biorreactores más utilizados en el campo de la biotecnología, debido a que son de manejo fácil y sencillo, además de que en estos se pueden modificar las condiciones operacionales. La poca supervisión y material que necesitan, hacen de los matraces agitados, los biorreactores ideales para llevar a cabo diversos experimentos (Van Suijdam et al., 1978).

Las variables involucradas en el uso de matraces agitados van desde las características del matraz, como son; la forma del matraz (con o sin baffles), el tamaño y tipo de material, así como de las condiciones operacionales del cultivo, como son; velocidad de agitación, volumen de llenado y diámetro de agitación (Büchs, 2001). Para la exploración y desarrollo de bioprocesos a nivel industrial y académico, principalmente utilizando como microorganismos a bacterias, levaduras y hongos, se han utilizado matraces Erlenmeyer de una capacidad de 25 mL hasta 6 L (Büchs, 2001).

Las ventajas de utilizar matraces agitados, como primer paso para el escalamiento de fermentaciones a un mayor volumen, es la cantidad de información que se puede obtener de dichos matraces, ya que se pueden realizar un gran número de experimentos simultáneos; en los cuales se puede evaluar el crecimiento celular y los parámetros cinéticos bajo diferentes condiciones de cultivo, lo que permite la comparación entre distintos medios de cultivo, o parámetros de cultivo como son el pH y la temperatura, así mismo, permiten probar y verificar métodos analíticos.

3.2 Transferencia de oxígeno en matraces agitados.

La velocidad de transferencia de oxígeno (VTO), representa la transferencia de oxígeno del aire hacia las células durante una fermentación, y ocurre en 3 pasos (Stanbury et al., 1995):

1. La transferencia de oxígeno desde la burbuja hacia la solución.
2. La transferencia del oxígeno disuelto del medio de fermentación hacia la célula microbiana.
3. La asimilación del oxígeno disuelto por la célula.

La VTO ha sido uno de los parámetros más estudiados para conocer el estado fisiológico de los cultivos aerobios, donde el metabolismo depende del consumo de oxígeno. Se han realizado estudios para evaluar la velocidad de transferencia de oxígeno en matraces agitados durante una fermentación (Anderlei y Büchs, 2001; Anderlei et al, 2004). En estos se pueden observar los cambios en la evolución de la VTO durante el cultivo cuando hay una limitación de sustrato y/o oxígeno, una inhibición de crecimiento por la excreción de un metabolito, o la presencia de una diauxia (Anderlei & Büchs, 2001).

En matraces agitados la VTO en la interfase gas-líquido puede calcularse por la ecuación descrita por Maier & Büchs., 2001:

$$VTO = k_L a L_{O_2} (P_{O_2, gas} - P_{O_2, liquido}) \quad (\text{Ec. 1})$$

La ecuación anterior nos dice que la VTO es proporcional al coeficiente de transferencia de masa (k_L), el área específica de transferencia (a), la solubilidad del oxígeno (L_{O_2}) y la diferencia de presión sobre la interfase gas-líquido ($P_{O_2, gas} - P_{O_2, liquido}$).

Los parámetros operacionales que afectan la velocidad de transferencia de oxígeno (VTO) en matraces agitados son:

- Forma del matraz y tamaño.
- Velocidad de agitación.
- Diámetro de agitación.
- Volumen de llenado.
- Propiedades de la superficie del matraz: hidrofóbica, hidrofílica.
- Propiedades del líquido: viscosidad, solubilidad del oxígeno y difusividad.

Además se ha reportado que el coeficiente de transferencia de masa y el área específica de transferencia, se ven afectados por la viscosidad del medio de cultivo (Maier & Büchs., 2001).

3.3 Consumo de potencia en matraces agitados.

Cuando se quiere escalar un proceso microbiano de matraces agitados a un biorreactor de mayor tamaño, es muy importante obtener una reproducibilidad de resultados entre ambos casos. Uno de los parámetros utilizados para el escalamiento de bioprocesos es el consumo

de potencia volumétrica, que además, nos ayudan a caracterizar las condiciones del cultivo en biorreactores.

Los parámetros que influyen directamente en el cultivo, tales como suministro de oxígeno, eliminación del dióxido de carbono, mezclado y homogeneidad, o la dispersión de una fase líquida orgánica, tienen una relación estrecha con el consumo de potencia (Büchs et al., 2001). El consumo de potencia en matraces agitados a bajas viscosidades, se puede determinar por el número modificado de Newton (Ne'), que está en función del número de Reynolds (Re) (Büchs et al., 2000a):

$$Ne' = \frac{P}{\rho n^3 d^4 V_L^{1/3}} \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde P es la potencia mecánica, ρ es la densidad, n es la frecuencia de agitación, d el diámetro del matraz y V_L el volumen de llenado.

El consumo de potencia se ve afectado por los parámetros operacionales (Büchs et al., 2000a):

- Velocidad de agitación
- Volumen de llenado
- Tamaño del matraz
- Diámetro de agitación

Un aumento en la velocidad de agitación, incrementa el consumo de potencia, mientras que al incrementar el volumen de llenado el consumo de potencia disminuye, esto debido a que el área de fricción entre la pared del matraz y el líquido no aumenta de forma proporcional al volumen de llenado (Büchs et al., 2000a).

3.3.1 Fenómeno “ fuera de fase” en matraces agitados.

Un incremento en la viscosidad del líquido, se refleja en un incremento en el consumo de potencia, esto debido a que hay un aumento en la fricción entre el líquido y la pared del matraz. Sin embargo a viscosidades iguales o mayores de 35 mPa.s, el líquido del matraz se encuentra principalmente en la base del matraz, y solamente una pequeña fracción del líquido se encuentra girando en la pared del matraz. Esta disminución de la fricción, da como resultado

una disminución en el consumo de potencia. Este fenómeno se denominó “fuera de fase” (Büchs et al., 2000b).

Para determinar si se encuentra dentro o fuera de fase, Büchs et al (2000b), propusieron el siguiente número adimensional llamado número de fase (Ph):

$$Ph = \frac{d}{do} \left\{ 1 + 3 \log \left[\frac{\rho(2\pi n) d^2}{\eta} \left(1 - \sqrt{1 - \frac{4}{\pi} \left(\frac{V_l^{1/3}}{d} \right)^2} \right)^2 \right] \right\} \quad (\text{Ec. 3})$$

En donde, para un valor de Ph de los puntos experimentales mayor a 1.26, se dice que el cultivo se encuentra dentro de fase (Büchs et al., 2000b).

3.4 Características y aplicaciones del alginato

El alginato es un polímero constituido por el ácido β -D-manurónico (M) y su epímero en C-5 el ácido α -L-gulurónico (G), que se distribuyen a través de la cadena lineal, formando bloques consecutivos homopoliméricos (MMMM o GGGG) o heteropoliméricos (GMGMGM).

El alginato se obtiene principalmente de algas pardas, debido a que más del 40 % del peso seco constituye el polisacárido, y se pueden obtener de bacterias, del género *Pseudomonas* y

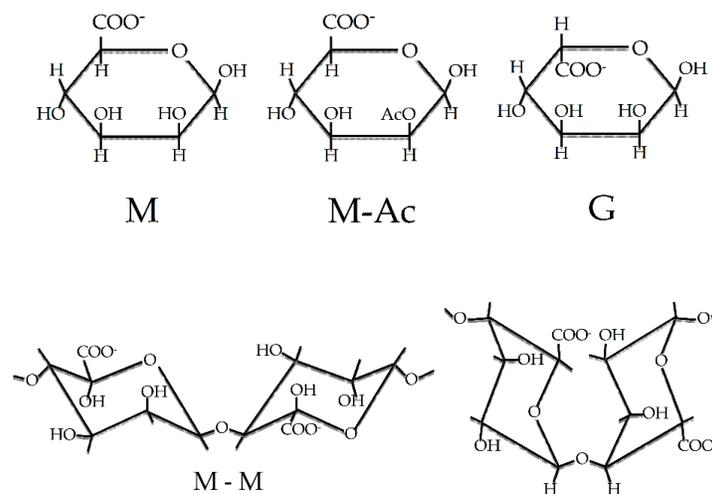


Figura 3.1. Conformación y composición del alginato, donde M es el ácido β -D-manurónico, G es igual α -L-gulurónico, y Ac es un grupo acetilo (López, 2018).

Azotobacter (Sabra et al., 2001). Estos últimos pueden presentar grupos acetilo en los residuos de ácido β -D-manurónico.

Las aplicaciones industriales de los alginatos, se deben a sus propiedades gelificantes, viscosificantes y estabilizantes, y estas propiedades son altamente dependientes de las características químicas del polímero.

La aplicación del alginato en el campo médico, se debe a su biocompatibilidad, la capacidad de formar geles y su biodegradabilidad (Flores et al., 2014). En el campo biomédico, se buscan alginatos de alto peso molecular, ya que se utilizan en la liberación de fármacos, proteínas o enzimas, y debido a que se someten en condiciones ácidas, pueden llegar a afectar las propiedades del alginato de bajo peso molecular (Draget y Taylor, 2011).

La capacidad del alginato para inducir viscosidad a una solución depende, principalmente, del peso molecular, pero también del grado de acetilación (en el caso del alginato bacteriano) y la proporción de los monómeros (M/G). Mientras que la capacidad para formar geles está más ligada a la capacidad del alginato para interactuar con iones divalentes, como el calcio (Ca^{2+}).

La composición del alginato producido por las algas es muy variable, debido a que depende de muchos factores, y su peso molecular promedio va desde los 50 kDa a 186 kDa. En contraste, en el caso de los alginatos bacterianos, es fácil obtener polímeros con características específicas, en términos del peso molecular (el cual puede ser de hasta 4000 kDa) y la proporción M/G, modificando las condiciones de cultivo (Flores et al., 2014). Por esta razón tienen un mayor potencial en el mercado para su aplicación en diversos sectores industriales.

Tabla 3.1. Aplicaciones de los alginatos

Sector industrial	Aplicación	Referencia
Alimenticia	Estabilizador (preparación de helados)	Avendaño et al.,(2013)
	Espesante (salsas, jarabes, pasteles)	Avendaño et al., (2013) Flores et al., (2014)
	Emulsificadores (mayonesa, aderezos)	Avendaño et al., (2013) Clementi, (1997)
Biomédico	Excipiente (encapsulado y liberación de fármacos)	Draget y Taylor, (2011) Flores et al., (2014) Clementi, (1997)
	Agente inmovilizador (trasplantes de órganos)	Draget y Taylor, (2011) Flores et al., (2014)
	Agente antibacterial	Draget y Taylor, (2011)
Ingeniería de tejidos	Formación de vasos sanguíneos	Young Lee y Mooney, (2012)
	Regeneración de huesos	Young Lee y Mooney, (2012)
	Regeneración de músculo, nervios, páncreas e hígado	Young Lee y Mooney, (2012)

3.5 *Azotobacter vinelandii* como modelo de producción de alginato

Azotobacter vinelandii es una eubacteria de vida libre, no patógena, aerobia estricta que habita en suelos y aguas frescas. Son células pleomórficas, variando su morfología desde cocos hasta bacilos y se reproduce por fisión binaria. Es un organismo quimiorganotrófico, que puede usar una gran variedad de fuentes de carbono: alcoholes, ácidos orgánicos y azúcares (Clementi, 1997).

A. vinelandii es capaz de fijar nitrógeno atmosférico por tres sistemas nitrogenasa. Además de poseer una alta capacidad respiratoria que en condiciones diazotróficas es hasta 10 veces más alta que la de *Escherichia coli* (Espín, 2002).

Es capaz de producir dos polímeros: el polihidroxiбутирато (PHB) y el alginato. El alginato es producido por *A. vinelandii* como un polisacárido extracelular capsular como un componente de la capa de quiste durante el proceso de enquistamiento, el cual tiene un rol protector al estrés mecánico y la desecación durante condiciones ambientales adversas (Urtuvia et al., 2017).

3.6 Metabolismo y biosíntesis del alginato en *A. vinelandii*

La principal vía de asimilación de glucosa en *A. vinelandii* es la ruta Entner-Doudoroff, esta ruta es común en bacterias Gram negativas. A través de esta ruta, *A. vinelandii* puede dirigir la fuente de carbono hacia tres rutas principales: al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT), a la producción de alginato y/o a la producción de polihidroxiбутирато (PHB) (Fig. 3.2).

La ruta de biosíntesis del alginato en *A. vinelandii*, puede dividirse en tres etapas: la formación del precursor (ácido GDP-manurónico), la polimerización y finalmente, la modificación y transporte del polímero (Fig. 3.2).

1) Formación del precursor: la fructosa-6-P es isomerizada en manosa-6-P por la enzima bifuncional fosfomanosa isomerasa/guanosina difosfomanosa pirofosforilasa (PMI-GMP o AlgA), posteriormente la manosa-6-P es convertida por la fosfomanosamutasa (PMM o AlgC) en manosa-1-P; PMI-GMP (AlgA) cataliza la conversión de manosa-1-P a GDP-manosa y finalmente la GDP-manosa es oxidada por la GDP-manosa deshidrogenasa (GMD o AlgD) a ácido GDP-manurónico.

2) Polimerización: el ácido GDP-manurónico es polimerizado por las proteínas Alg8 y Alg44.

3) Modificación y transporte: el polímero resultante en la polimerización es modificado por un complejo acetilasa (AlgI, AlgV y AlgF), y los residuos de ácido manurónico no acetilados son epimerizados a guluronato por la manuronato epimerasa (ME o AlgG). Finalmente, el alginato es transportado fuera del periplasma por la proteína AlgJ, una vez en el espacio extracelular puede ser epimerizado por una familia de 7 epimerasas (AlgE1-7).

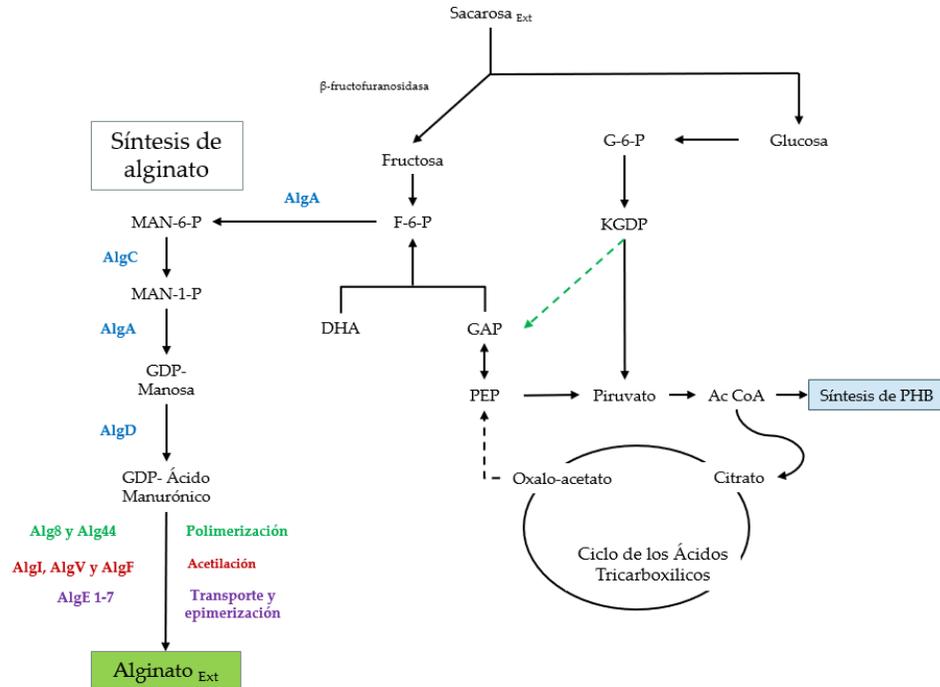


Figura 3.2. Ruta de biosíntesis del alginato en *A. vinelandii* (Castillo, 2013. López, 2018)

3.7 Regulación de la biosíntesis del alginato

Se han identificado los genes que codifican las enzimas para la biosíntesis de alginato, que conforman un operón *algD-8-44-K-J-G-X-L-I-V-F-A*. Además de diversos promotores para la transcripción de la biosíntesis del alginato; *algDp1*, *algDp2* y *algDp3* ubicados río arriba de *algD*, *alg8p* río arriba de *alg8*, y un promotor putativo sigma 70 río arriba de *algG*, dos promotores (*algCp1* y *algCp2*) río arriba de *algC* (Galindo et al., 2007).

La expresión de los genes de la biosíntesis del alginato se ha demostrado que están bajo el control del grupo de genes *algUmucABCD* (Galindo et al., 2007). Donde el producto del gen *algU*, regula positivamente la biosíntesis del alginato (Núñez et al., 2000; Martínez-Salazar et al., 1996), la proteína AlgU es un factor alternativo sigma E, que es necesario para la transcripción de los promotores *algCp1* y *algDp2*, de los genes *algC* y *algD*, que están involucrados en la biosíntesis de los precursores del alginato.

Así mismo la transcripción de *algU*, está regulada por el producto de los genes *mucABCD*, en donde se ha reportado que las proteínas MucA y MucC actúan como factores antisigma E, y

por lo tanto regulan negativamente la producción de alginato (Galindo et al., 2017; Núñez et al., 2000).

Se ha reportado que la proteína MucG, regula negativamente la síntesis y polimerización del alginato, y que la inactivación de esta proteína da como fenotipo la sobreproducción de alginato de alto peso molecular, debido a un aumento en la actividad de los genes *algD* y *alg8*, que están involucrados en la formación y polimerización del alginato.

3.8 Estrategias de cultivo que afectan la producción y las propiedades químicas del alginato producido por *A. vinelandii* .

3.9 Efecto de la velocidad de transferencia de oxígeno

La velocidad de transferencia de oxígeno (VTO) es uno de los parámetros para mejorar la producción y calidad del alginato producido por *A. vinelandii*. Se han realizado estudios, en donde se ha evaluado el efecto de la aireación sobre el peso molecular de los alginatos y diversos autores han descrito el efecto positivo de la limitación de oxígeno (baja VTO) sobre el peso molecular del alginato.

Peña et al., (2011), reportó alginatos con pesos moleculares mayores a los 1000 kDa, bajo condiciones de baja transferencia de oxígeno (menores a $7 \text{ mmolL}^{-1}\text{h}^{-1}$), así mismo, determinó la capacidad viscosificante de los alginatos, en donde obtuvo los valores más altos en condiciones de baja aireación.

En el trabajo de Gómez et al., (2015), se sometió a la cepa *A. vinelandii* ATCC9046 a bajas velocidades de transferencia (VTO) modificando la velocidad de agitación y el volumen de llenado, y en este trabajo se obtuvieron alginatos con pesos moleculares de hasta 2000 kDa. Esto impactó positivamente en la viscosidad del caldo de cultivo, en donde obtuvieron viscosidades aparentes de hasta 35 mPa.s (a una velocidad de corte igual a 300s^{-1}). En ese estudio los valores de peso molecular más altos para los alginatos se obtuvieron en los cultivos desarrollados a muy bajas velocidades de transferencia de oxígeno ($\approx 2 \text{ mmolL}^{-1}\text{h}^{-1}$)

3.10 Modificaciones genéticas en *A. vinelandii*

Debido a que *A. vinelandii* puede presentar modificaciones estables en su genoma (Noar and Bárcena, 2018), la ingeniería genética ha sido utilizada para la modificación de cepas, para la

sobreproducción de alginato o con la capacidad de producir alginato de alto peso molecular. Dando así una gran diversidad de cepas mutantes entre las que se encuentran:

3.10.1 *A. vinelandii* OP AlgU+

Cepa modificada de *A. vinelandii* OP (Bush y Wilson, 1959), en la cual se insertó el gen *algU*, que regula positivamente la trascricpción de los genes estructurales de la biosíntesis del alginato (Castillo et al., 2018).

En esta cepa se observó la producción de alginato en contraste con la cepa parental (OP) que no produce alginato. Se obtuvo una concentración de alginato de 4 gL^{-1} , presentando valores similares en producción de alginato que la cepa *A. vinelandii* ATCC9046, la cual es una cepa sobre productora. Sin embargo, cuando se compararon los perfiles de VTO, se observa una disminución en la VTO en la cepa OP AlgU+, esto podría sugerir cambios en la reología del medio, respecto a un aumento en la viscosidad del caldo de cultivo y por lo tanto que el alginato presenta características diferentes al de la cepa ATCC9046 (Castillo et al., 2018).

3.10.2 *A. vinelandii* GG9

Cepa derivada de *A. vinelandii* AEIV, en la cual se interrumpió el gen *mucG*, que codifica para la proteína MucG, que regula negativamente la biosíntesis del alginato. La cepa resultante presentó una sobreproducción de alginato de alto peso molecular cuando se comparó con su cepa parental. Además, en esta cepa se observó un aumento en la expresión de los genes *algD* y *alg8*. Por otra parte, a diferentes velocidades de transferencia de oxígeno (menores a $5.2 \text{ mmolL}^{-1}\text{h}^{-1}$), las características del alginato producido por esta cepa, no se vieron afectados, presentando pesos moleculares similares en ambas condiciones.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Estudiar la producción de alginato en las cepas modificadas genéticamente de *A. vinelandii* OP AlgU+ y GG9 bajo dos velocidades de transferencia de oxígeno (VTO).

4.2 Objetivos específicos

- Caracterizar la producción de alginato en cultivos de las cepas modificadas de *A. vinelandii* (OP AlgU+ y GG9) a dos diferentes VTO.
- Analizar la viscosidad del caldo de cultivo y el peso molecular del alginato producido por las cepas *A. vinelandii* OP AlgU+ y GG9.
- Evaluar la evolución de la potencia volumétrica y la VTO en cultivos de las cepas modificadas de *A. vinelandii* (OP AlgU+ y GG9).

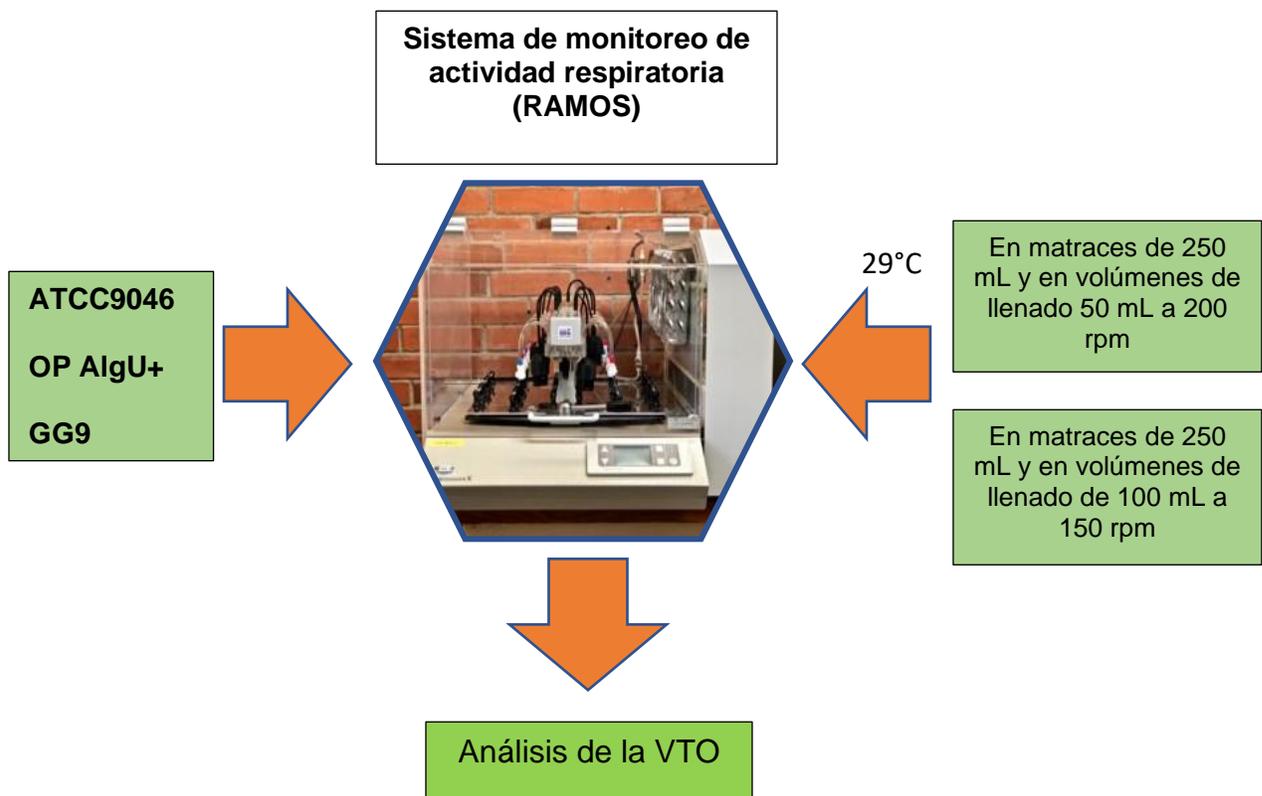
5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para lograr los objetivos planteados, se realizaron experimentos en matraces de 250 mL a 29°C, en dos condiciones de VTO, la denominada de alta transferencia, con un volumen de llenado de 50 mL a 200 rpm y la de baja transferencia, con un volumen de llenado de 100 mL a 150 rpm. Los parámetros respirométricos se monitorearon en línea en el equipo RAMOS (por sus siglas en inglés “Respiratory activity monitoring system”), para así determinar la VTO.

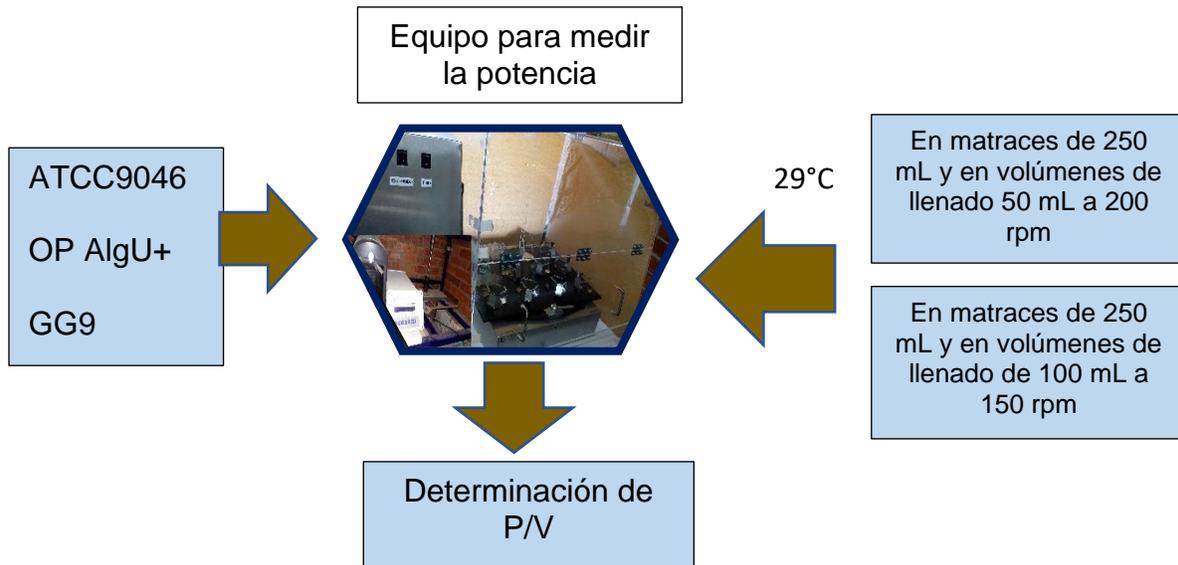
Para determinar el consumo de potencia volumétrica, se monitoreo en un equipo en línea para medir dicho parámetro. Para analizar los parámetros cinéticos, tales como crecimiento celular, consumo de sustrato y cuantificación del polímero, se realizaron experimentos en paralelo (fuera de línea), con las mismas condiciones establecidas anteriormente.

Las cepas de *A. vinelandii* que se utilizaron fueron: la GG9 y OP AlgU+ ambas cepas productoras de alginato y PHB. Y se utilizó la cepa ATCC9046 como cepa control.

A) En línea: Estudio de los parámetros respirométricos



B) En línea: estudio del consumo de potencia volumétrica



C) Fuera de línea: Caracterización cinética y caracterización del polímero

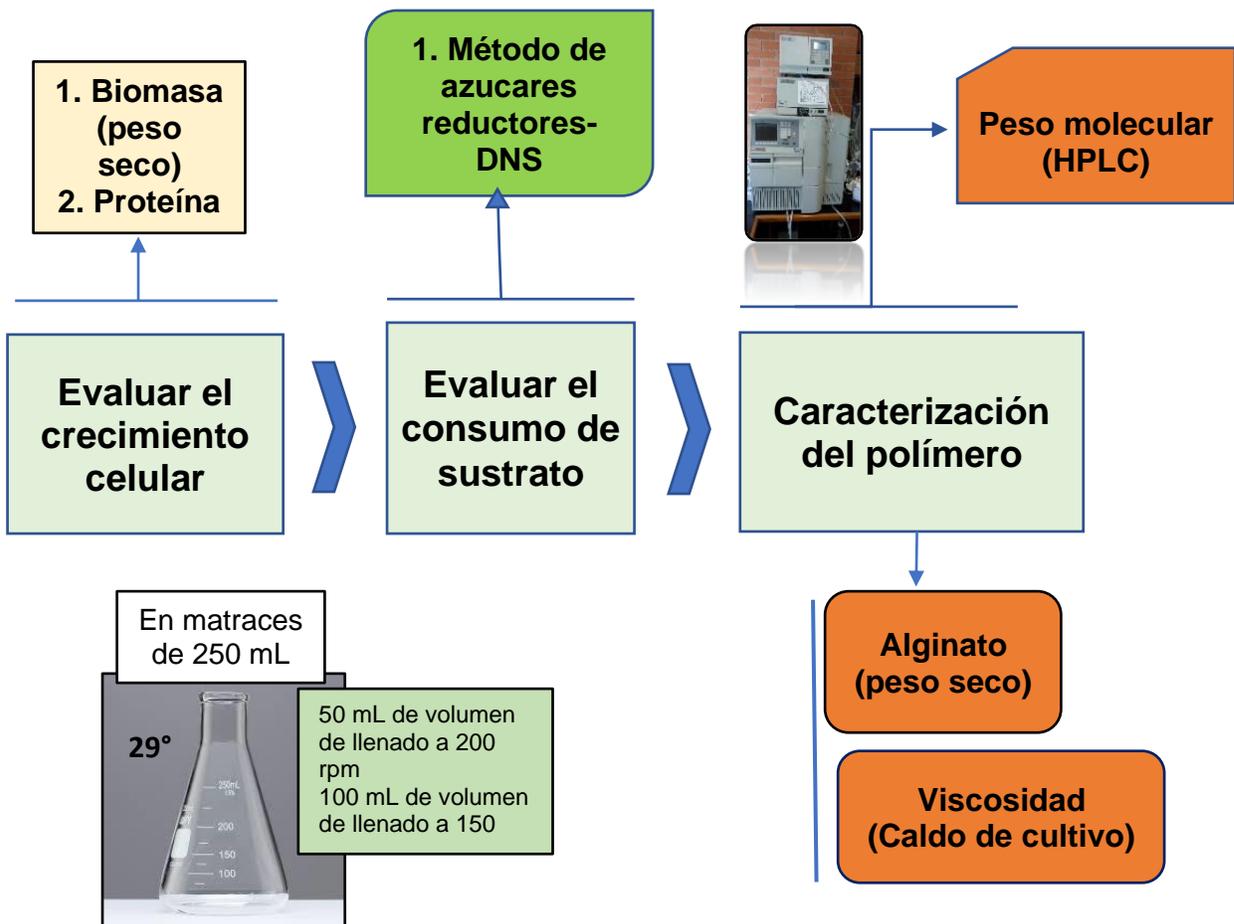


Figura 5.1. Esquema de la estrategia experimental utilizada en este trabajo.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Cepas

Las cepas utilizadas de *A. vinelandii* durante el desarrollo de este trabajo, son descritas en la Tabla 6.1.

Tabla 6.1. Cepas utilizadas en este trabajo

Cepa	Descripción	Referencia
ATCC9046	Cepa silvestre	Gómez et al., 2015
OP AlgU+	Derivada genética de <i>A. vinelandii</i> OP, en la cual tiene activado el gen <i>algU</i>	Castillo et al., 2018.
GG9	Derivada genética de <i>A. vinelandii</i> AEIV, que tiene una mutación en el gen <i>mucG-miniTn5</i>	Ahumada-Manuel et al., 2017.

6.2 Preservación de las cepas

Las cepas se preservaron en cajas Petri, con medio Burk-sacarosa con extracto de levadura (Tabla 6.3).

Para cada una de las cepas se utilizaron los antibióticos, señaladas a continuación (Tabla 6.2).

Tabla 6.2. Antibióticos utilizados para la preservación de las cepas de *A. vinelandii*

Cepa	Antibiótico	Concentración (µg/mL)
OP AlgU+	Kanamicina	2
GG9	Espectinomicina	50

6.3 MEDIO DE CULTIVO

El medio de cultivo que se utilizó (Burk-sacarosa con extracto de levadura) se describe a continuación (Tabla 6.3).

Tabla 6.3. Composición del medio Burk-sacarosa con extracto de levadura

Reactivo	Cantidad (g/L)
Sacarosa	20
K ₂ HPO ₄	0.66
KH ₂ PO ₄	0.16
CaSO ₄	0.05
NaCl	0.2
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.2
Na ₂ Mo 2H ₂ O	0.0029
FeSO ₄ 7H ₂ O	0.027
MOPS (ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico)	1.42
Extracto de levadura	3
Se ajustó el pH a 7.2 con una solución de NaOH a 2 N. Se esterilizó durante 20 minutos a 121 °C.	

El medio de cultivo se esterilizó en tres soluciones separadas: la primera en una solución concentrada de CaSO₄, la segunda en otra solución concentrada de NaCl, MgSO₄ 7H₂O, Na₂Mo 2H₂O y FeSO₄ 7H₂O, y finalmente una solución con sacarosa, K₂HPO₄, KH₂PO₄, MOPS y extracto de levadura. Después del proceso de esterilización, en condiciones estériles se mezclaron las tres soluciones.

6.4 Desarrollo de los cultivos

6.4.1 Preparación del pre-inóculo

El pre-inóculo se desarrolló en cajas Petri con medio BS con extracto de levadura sólido. Los cultivos se incubaron a 29 °C en una incubadora Boekel Scientific (modelo 132000) durante 72 horas.

6.4.2 Preparación del inóculo

El inóculo se desarrolló en matraces de 500 mL, con un volumen de llenado de 100 mL de medio BS con extracto de levadura, sin antibiótico, en una incubadora rotatoria a 29 °C y 200 rpm. Cada matraz se inoculó (con las cepas de estudio) con dos asadas tomadas del pre-inóculo. Se incubaron durante 24 horas, bajo estas condiciones y mediante una dilución 1:10

se obtuvo una densidad óptica (D.O) entre 0.5 y 0.6 (Absorbancia a 560nm). Al alcanzar esta D.O se inocularon los matraces con un décimo del volumen final.

6.4.3 Cultivo en matraces agitados

Los experimentos se desarrollaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL a 29 °C. Se realizaron en dos condiciones de VTO diferentes, empleando para la condición de alta transferencia un volumen de llenado de 50 mL a 200 rpm, y para la condición de baja transferencia un volumen de llenado de 100 mL a 150 rpm. Los cultivos fueron desarrollados en línea en el equipo RAMOS (Kunher shaker) para obtener la VTO, y para la medición de la potencia, con base en el principio descrito por Büchs (Büchs et al., 2000, apartado 6.6).

Fuera de línea (en paralelo) en una incubadora rotatoria para la caracterización cinética y cuantificación del polímero.

En la condición de alta transferencia se tomó muestra cada 12 horas, hasta cumplir 72 horas. En la condición de baja transferencia se tomó muestra cada 12 horas hasta cumplir 84 horas. Todos los cultivos se realizaron por duplicado.

6.5 Determinación de la VTO

Los valores de la VTO fueron determinados por el equipo RAMOS en línea en condiciones estériles (Anderlei y Büchs, 2001), el equipo está compuesto por (Figura 6.1):

- a) Plataforma de agitación, con un diámetro de 25 mm, con capacidad de 8 matraces de 250 mL.
- b) Matraces de 250 mL, con válvulas de entrada (B1) y salida (B2) de aire.
- c) Sensor galvánico de oxígeno (O₂) y dióxido de carbono (CO₂), los cuales durante el ciclo de medición se monitorean las presiones parciales de los dos gases. Estos sensores se encuentran en cada uno de los matraces, por lo que son independientes cada uno.
- d) Sistema regulador de temperatura, que consta de un control de temperatura, un baño maría, y la cabina en donde se coloca la plataforma de agitación.
- e) Unidad de control y registro de datos (computadora), que muestra la evolución de la VTO.



Figura 6.1. Equipo RAMOS, A) Plataforma de agitación, B) Matraz de 250 mL con entrada y salida de gases, C) Sensor galvánico, D) Regulador de temperatura y E) Unidad de control.

El ciclo de mediciones del equipo se divide en dos etapas:

1. Suministro de aire a cada matraz, con un flujo de 1.5 L h^{-1} .
2. Fase de medición: durante esta fase, las válvulas de entrada y salida de cada matraz se cierran, posteriormente se monitorean las presiones parciales de O_2 y CO_2 , las cuales disminuyen y aumentan respectivamente, debido a la actividad respiratoria de la bacteria. Estas presiones parciales se miden en los sensores galvánicos, y se puede calcular la VTO con la ecuación 4. El ciclo de mediciones se repite durante toda la fermentación.

$$VTO = \frac{no_2}{VI * t} = \frac{\Delta po_2}{\Delta t} * \frac{Vg}{RTV} \left[\frac{mol}{Lh} \right] \quad (\text{Ec.4})$$

6.6 Determinación de la potencia volumétrica

Se determinó utilizando un equipo para medir la potencia volumétrica (Pliego, 2014), el cual está constituido por:

- a) Control de temperatura
- b) Plataforma de agitación
- c) Control de agitación
- d) Sensor de torque

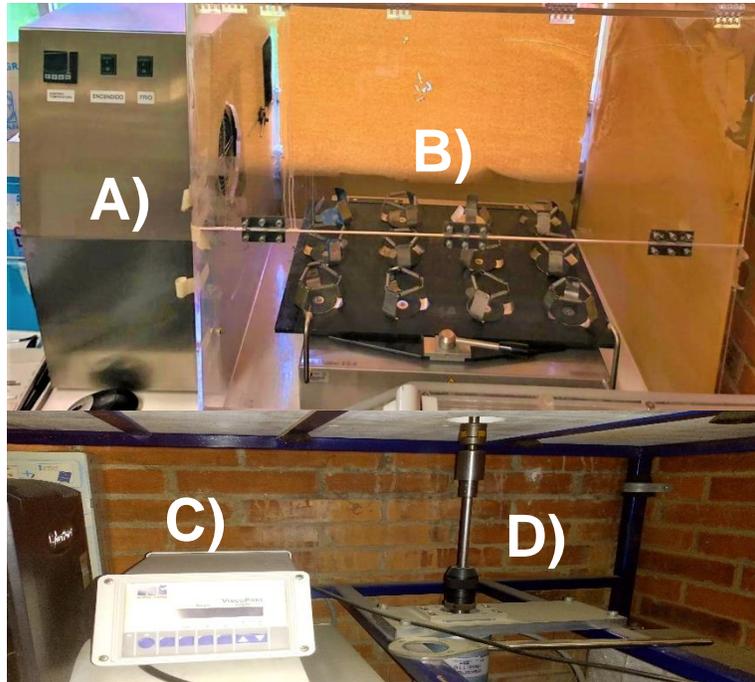


Figura 6.2. Equipo para medir el consumo de potencia volumétrica en matraces, A) Control de temperatura, B) Plataforma de agitación, C) Control de agitación, D) Sensor de torque.

La plataforma de agitación es alimentada por un vibrador que tiene un sensor de par (0-1 Nm). Los datos de par y velocidad se graban y guardan en una PC a través de un convertidor A/D, que convierte la deformación elástica en una señal de salida de voltaje. La pérdida de fricción mecánica y la resistencia de los matraces, se compensa realizando una calibración con agar sólido del mismo peso que los matraces experimentales. El consumo de potencia se puede estimar mediante una diferencia entre las mediciones de líquido y sólido (Büchs et al., 2000):

$$\frac{P}{V} = \frac{2 * \pi * n * (M_{liq} - M_{sol})}{V} \quad (\text{Ec. 5})$$

En donde: n es la velocidad de agitación, M_{liq} el par de torsión del cultivo, M_{sol} el par de torsión del agar y V es el volumen total de los matraces.

6.7 Métodos analíticos (fuera de línea)

6.7.1 Determinación de biomasa total

La biomasa total se determinó por el método gravimétrico de peso seco.

Para lo cual se tomaron 10 mL de caldo de cultivo y se mezclaron con 1 mL de NaCl 1M y 1 mL de Na₂EDTA 0.1 M, se centrifugaron a 11000 rpm durante 30 minutos a 25 °C, en una centrifuga marca Eppendorf (modelo 5810 R). Se separó el sobrenadante y la biomasa húmeda se filtró en membranas Millipore de 0.22 µm de tamaño de poro (previamente a peso constante). Las membranas con biomasa se secaron en una estufa (Felisa) durante 24 horas a 80 °C. Posteriormente se colocaron en un desecador durante 2 horas hasta llegar a una temperatura ambiente. Finalmente se pesaron y por diferencia de peso, se determinó la cantidad de biomasa, expresada en g L⁻¹ de medio de cultivo.

6.7.2 Cuantificación de alginato

La concentración de alginato se determinó por el método gravimétrico de peso seco.

Se tomaron 10 mL de caldo de cultivo y se mezclaron con 1 mL de NaCl 1M y 1mL de Na₂EDTA 0.1M, se centrifugaron a 11000 rpm durante 30 minutos a 25 °C, en una centrifuga marca Eppendorf (modelo 5810 R). Se recuperó el sobrenadante y se le adicionaron 30 mL de 2-propanol, la mezcla se dejó reposar en el cuarto frío durante 24 horas para favorecer la precipitación del alginato.

La solución con el alginato resuspendido se filtró en membranas Millipore de 0.45 µm de tamaño de poro (previamente a peso constante). Las membranas con el alginato se secaron en una estufa (Felisa) durante 24 horas a 80 °C. Posteriormente, se colocaron en un desecador durante 2 horas hasta llegar a una temperatura ambiente. Finalmente, se pesaron y por diferencia de peso, se determinó la concentración de alginato expresada en g L⁻¹ de medio de cultivo.

6.7.3 Determinación de sacarosa

Se utilizó el método de β-fructofuranosidasa DNS, que consiste en la hidrólisis de la sacarosa con la enzima β-fructofuranosidasa (invertasa) y posteriormente la cuantificación de los azúcares reductores por la reducción del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). En la reacción se forma un compuesto nitro-aminado, cuya D.O medida a 540 nm es proporcional a la concentración de los grupos reductores (Miller, 1959).

Se prepararon las siguientes soluciones:

Solución de DNS: se pesaron 16 g de NaOH, 300 g de tartrato de Na y K y 10 g de ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS), y se mezclaron en 1 L de agua destilada, con adición lenta del DNS para evitar su precipitación.

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

Solución enzimática: se solubilizaron 2.5 mg de enzima β -fructofuranosidasa en 1 mL de amortiguador de citratos (pH 4.6).

Metodología

Se tomó 1 mL del caldo de cultivo y se centrifugó a 11000 rpm a 25°C en una centrifuga marca Eppendorf (modelo 5418). Se recuperó el sobrenadante y se realizó una dilución 1:20, de esta solución se tomaron 90 μ L en un tubo Eppendorf y se le añadieron 10 μ L de solución enzimática, se mezcló y se dejó incubando a temperatura ambiente durante 10 minutos.

Posteriormente, se adicionaron 100 μ L de la solución DNS, se mezclaron y se colocaron en baño maría durante 5 minutos e inmediatamente se enfriaron en hielo. Se añadieron 900 μ L de agua destilada y se agitó.

Se determinó la absorbancia a 540nm, contra un blanco constituido de la mezcla de reactivos y utilizando como muestra agua destilada. Los valores obtenidos se interpolaron con la curva patrón, constituida por soluciones de sacarosa con concentraciones de 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 gL^{-1} . (Fig. 6.3).

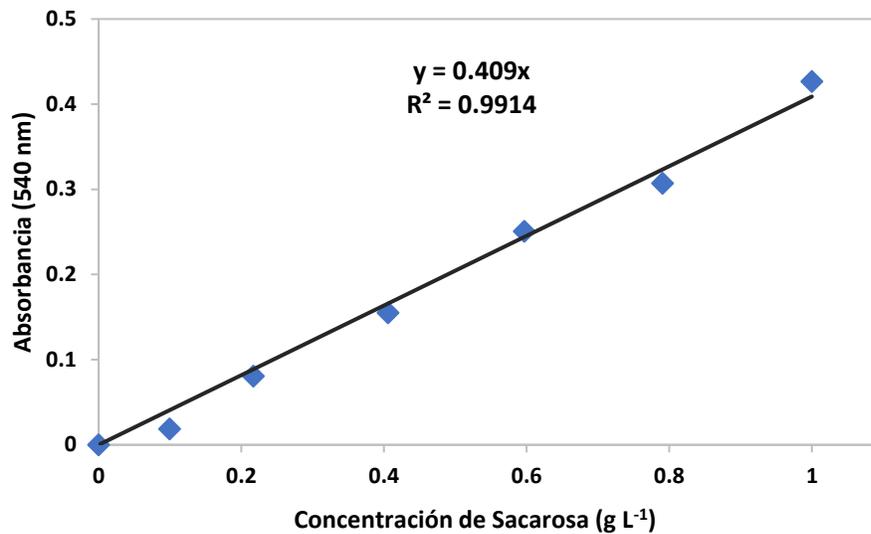


Figura 6.3. Curva patrón para la determinación de sacarosa

6.7.4 Determinación de proteína

Se utilizó el método de Lowry, que es un método colorimétrico de valoración cuantitativa de las proteínas. A las muestras se les añade un reactivo que forma un complejo de tonalidad azul con las proteínas, en donde la intensidad de color proporcional a la concentración de proteínas, según la Ley de Lambert-Beer.

Se prepararon las siguientes soluciones:

Solución A: una solución de Na_2CO_3 al 2% en NaOH 0.1 N.

Solución B: una solución de tartrato de Na y K al 2% en agua destilada.

Solución C: CuSO_4 al 1% en agua destilada.

Solución reactiva: se mezclaron 1 mL de solución B, 1 mL de solución C y 98 mL de solución A.

Reactivo de Folin: se realizó una solución 1:1 de reactivo de Folin y agua destilada.

Metodología

Se tomó 1 mL de caldo de cultivo y se centrifugó a 11000 rpm durante 20 minutos, se desechó el sobrenadante y se recuperó el pellet de biomasa. La biomasa se resuspendió en 1 mL de agua destilada y se agitó. Se tomaron 200 μL de esta solución en un tubo eppendorf y se añadió 1 mL de solución reactiva, se agitó y se dejó reposar 10 minutos a temperatura

ambiente. Posteriormente se adicionaron 100 μl de reactivo Folin, se agitó y se dejó reposar 30 minutos en oscuridad, pasado este tiempo, se centrifugaron por 2 minutos a 11000 rpm. Se determinó la absorbancia a 625 nm, contra un blanco constituido por todos los reactivos y como muestra agua destilada. Los valores obtenidos se interpolaron contra la curva patrón, constituida por soluciones de albumina bovina con concentraciones de 0.5, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 g L^{-1} (Figura 6.4).

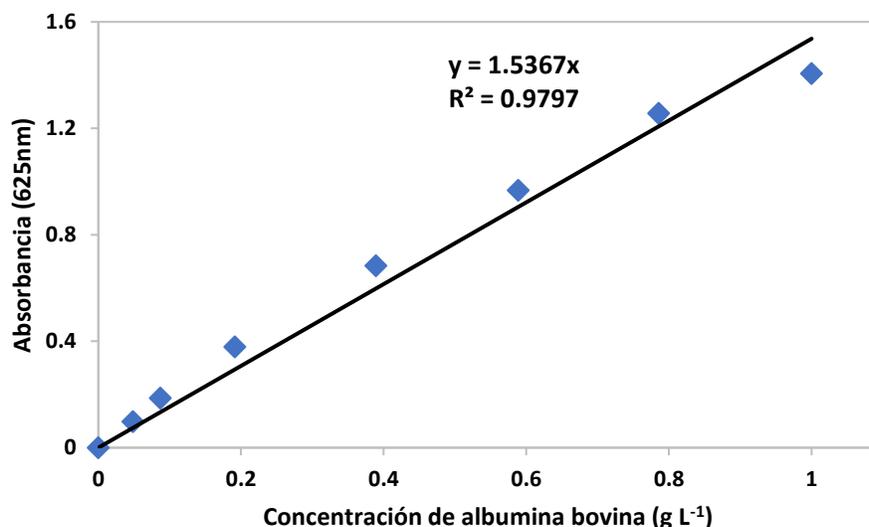


Figura 6.4. Curva patrón para la determinación de proteína

6.7.5 Determinación de la viscosidad del caldo de cultivo y capacidad viscosificante.

La viscosidad se determinó a través de las mediciones en un reómetro (AR 1000 TA Instruments Rheometers) utilizando una geometría de cono/plato (60 mm de diámetro con un ángulo de $1^{\circ} 0' 12''$) conectado a un convertidor A/D que envía la señal al software de adquisición de datos (Rheology Advantage TA).

Se tomó 1 mL de caldo de cultivo, y la medición se realizó variando la velocidad de corte de 10 a 1500 s^{-1} , a una temperatura constante igual a 22°C (Peña et al., 2011; Gómez et al., 2015).

La dependencia de la viscosidad sobre la velocidad de corte esta descrita por el modelo de Ostwald de Waele (ley de potencia):

(Ec. 6)

$$\eta = K\dot{\gamma}^{m-1}$$

Donde η es la viscosidad aparente, K es el índice de consistencia, m es el índice de flujo y $\dot{\gamma}$ es la velocidad de corte. Durante la medición de las muestras, se utilizó agua como fluido de referencia para verificar el equipo.

La capacidad viscosificante (CV) de una solución, se puede determinar a partir del ajuste exponencial de las curvas de viscosidad contra la concentración de alginato. La viscosidad del caldo de cultivo a una velocidad de corte de 300 s^{-1} (Peña et al., 2011; Gómez et al., 2015), se graficó contra la concentración de alginato de cada muestra y posteriormente se ajustó a un modelo exponencial para calcular la CV, dada por la siguiente ecuación:

$$\eta_{300} = e^{CV*[Alg]} \quad (\text{Ec. 7})$$

Donde η_{300} es igual a la viscosidad a 300 s^{-1} , CV es la capacidad viscosificante y [Alg] es la concentración de alginato.

6.7.6 Determinación del peso molecular del alginato

El peso molecular promedio se determinó mediante una cromatografía de permeación de gel (GPC) con una serie de columnas de Ultrahidrogel (UG 500 y Linear, Waters), utilizando un sistema de HPLC y como detector un refractómetro diferencial. Se utilizó NaNO_3 0.1 M como eluyente a $35 \text{ }^\circ\text{C}$ y un flujo de 0.9 mL min^{-1} . Se realizó una curva de calibración utilizando pululanos de *Aureobasidium pullulans* (5 a 2500 kDa).

Las muestras se prepararon, tomando 10 mL de caldo de cultivo y se mezcló con 1 mL de NaCl 1M y 1 mL de Na_2EDTA 0.1M, se centrifugó a 11000 rpm durante 30 minutos a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, en una centrifuga marca Eppendorf (modelo 5810 R). Se recuperó el sobrenadante y se le adicionaron 30 mL de 2-propanol, la mezcla se dejó reposar en el cuarto frío durante 24 horas para favorecer la precipitación del alginato.

Se tomó el alginato precipitado y se colocó en tubos eppendorf de 2 mL, y se dejaron secar en una centrifuga de vacío (Eppendorf vacufuge).

Se pesaron de 1-3 mg de alginato seco y se resuspendieron en 1 mL de agua milli-Q, las soluciones se colocaron en viales para inyectarlas en el HPLC.

6.8 Cálculo de los parámetros cinéticos

Los datos de la cinética de crecimiento microbiano fueron descritos por la ecuación logística (Klimek y Ollis, 1980):

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \left(1 - \frac{X}{X_{max}}\right) \quad (\text{Ec. 8})$$

Donde μ es la velocidad específica de crecimiento (h^{-1}) y X_{max} la concentración máxima de biomasa (gL^{-1}). Integrando la ecuación anterior se obtuvo la ecuación que describe el crecimiento bacteriano en el tiempo.

$$X(t) = \frac{X_0 e^{\mu t}}{1 - \left(\frac{X_0}{X_{max}}\right)(1 - e^{\mu t})} \quad (\text{Ec. 9})$$

Linealizando la ecuación y graficando contra el tiempo se obtuvo la velocidad específica de crecimiento (μ), representada por la pendiente de la recta.

La cinética de formación de producto en función de la biomasa se determinó por el modelo de Leudeking y Piret (1959):

$$\frac{dP_A}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X \quad (\text{Ec. 9})$$

Donde el término $\alpha \frac{dX}{dt}$ representa la producción asociada a la fase de crecimiento bacteriano, en donde α es un rendimiento de producto en base a biomasa. El término βX es la producción no asociada a la fase de crecimiento.

Combinando las ecuaciones de formación de biomasa y producto e integrando se obtuvo la ecuación para la formación de producto en el tiempo:

$$P_A(t) = P_{A_0} + \alpha X_0 \left[\frac{X_0 e^{\mu t}}{1 - \left(\frac{X_0}{X_{max}}\right)(1 - e^{\mu t})} \right] + \left(\frac{\beta X_{max}}{\mu} \right) \ln \left[1 - \left(\frac{X_0}{X_{max}}\right)(1 - e^{\mu t}) \right] \quad (\text{Ec.10})$$

Para el cálculo de la constante β se evalúa en la fase estacionaria de la cinética de crecimiento, donde $\frac{dX}{dt} = 0$, y $X = X_{max}$, obteniendo a partir de la ecuación 11 :

$$\beta = \frac{(dP_a/dt)}{X_{max}} \quad (\text{Ec. 11})$$

De un gráfico de $P_a(t) = P_{A_0} - \left(\frac{\beta X_{max}}{\mu}\right) \ln \left[1 - \left(\frac{X_0}{X_{max}}\right) (1 - e^{\mu t})\right]$ contra $\frac{X_0 e^{\mu t}}{1 - \left(\frac{X_0}{X_{max}}\right) (1 - e^{\mu t})}$ se calculó el valor de α representado por la pendiente.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Velocidad de transferencia de oxígeno

Los experimentos se realizaron en dos condiciones de VTO, las cuales se llevaron a cabo modificando las condiciones operacionales del cultivo. En la condición llamada de alta transferencia, se utilizó un volumen de llenado de 50 mL y una velocidad de agitación de 200 rpm, y la condición denominada de baja transferencia, se llevó a cabo con un volumen de llenado de 100 mL a 200 rpm.

En la Figura 7.1 podemos observar el perfil respirométrico de las tres cepas de *A. vinelandii*, en las dos diferentes condiciones. En la condición de baja transferencia, que corresponde a la Figura 7.1a, se observa que en los cultivos de la cepa ATCC9046 (cepa control), se alcanzó una VTO_{max} de $5.5 \text{ mmolL}^{-1}\text{h}^{-1}$ en las primeras horas del cultivo, y se mantuvo constante hasta las 40 horas, este perfil es característico de cultivos limitados por oxígeno (Anderlei & Büchs, 2001). Sin embargo, pasado este tiempo la VTO comenzó a disminuir hasta las 50 horas, posteriormente, presentó un incremento, hasta alcanzar una VTO máxima de $7.7 \text{ mmolL}^{-1}\text{h}^{-1}$. A las 60 horas de cultivo se observó un descenso de la VTO, lo cual se interpreta como el término del cultivo, debido a que las células comienzan a morir, por lo que la demanda de oxígeno disminuye.

En los cultivos de la cepa OP AlgU+, se observó un comportamiento similar a la cepa control. Se alcanzó una VTO_{max} de $6 \text{ mmolL}^{-1}\text{h}^{-1}$ en las primeras horas de cultivo y posteriormente comenzó a disminuir hasta las 35 horas, en ese momento se presentó un aumento de la VTO hasta $7 \text{ mmolL}^{-1}\text{h}^{-1}$, y este valor se mantuvo durante 10 horas, posteriormente, comenzó a disminuir, como una respuesta a la disminución de la tasa de respiración del cultivo.

En el caso de los cultivos de la cepa GG9, se alcanzó una VTO_{max} de $5.2 \text{ mmolL}^{-1}\text{h}^{-1}$ durante las primeras horas de cultivo, y este valor se mantuvo hasta las 30 horas, en ese momento comenzó a disminuir. Sin embargo, al igual que las otras dos cepas se presentó un aumento en la VTO, pero este no fue mayor que el valor de VTO_{max} inicial después de este aumento, la VTO comenzó a disminuir hasta las 60 horas, donde presentó un segundo aumento en la VTO, pero de igual forma que el primero no fue mayor que el valor de VTO_{max} inicial.

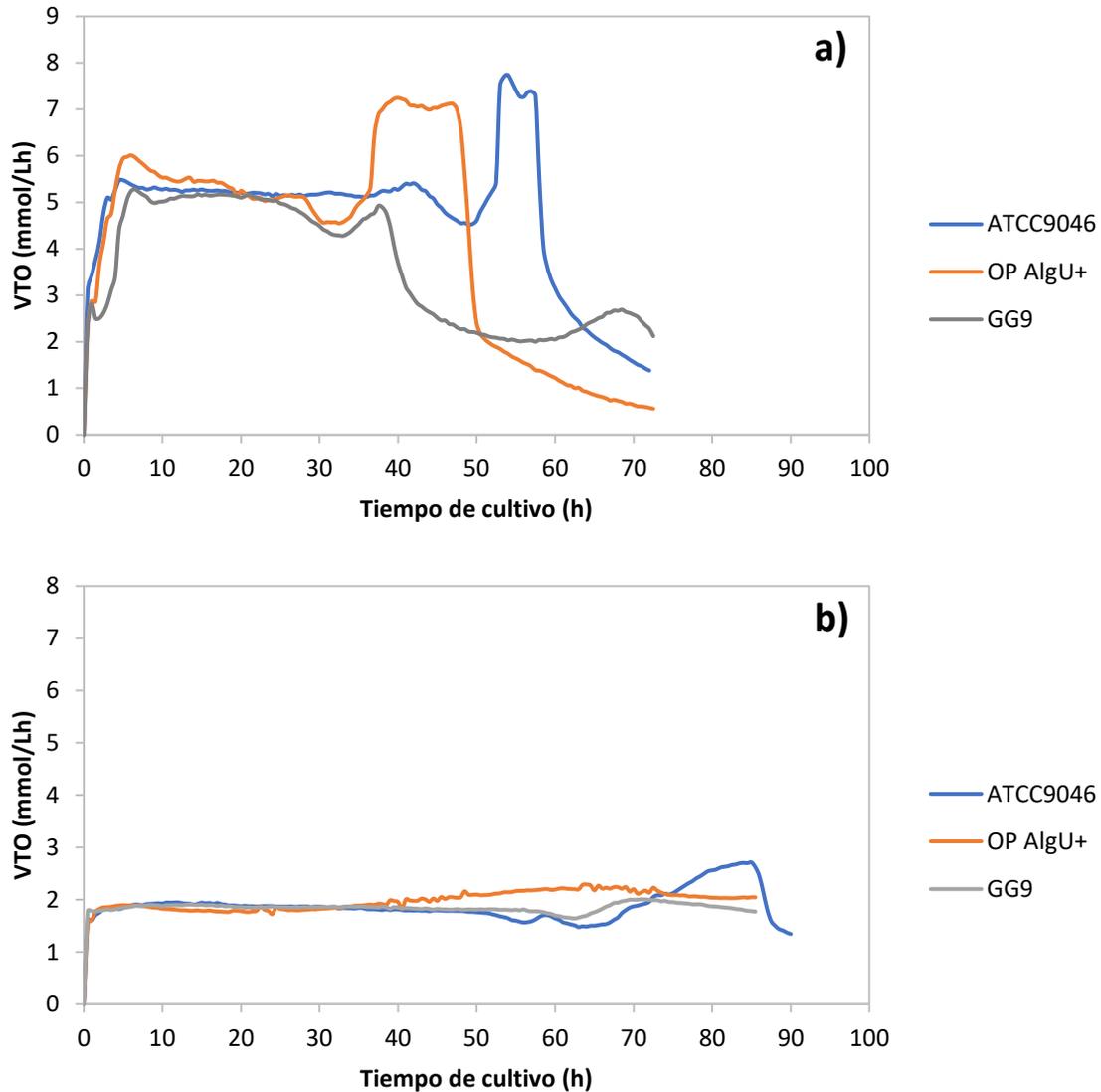


Figura 7.1. Evolución de la velocidad de transferencia de oxígeno en las cepas de *A. vinelandii* ATCC9046, OP AlgU+ y GG9. a) Alta transferencia b) baja transferencia

En las tres cepas se observó un incremento en la VTO, horas después de presentar una disminución de la VTO con respecto a la VTO_{max} alcanzada a las primeras horas de cultivo. Este fenómeno se puede atribuir a la presencia de una diauxia o a la limitación de un nutriente, ya que previamente se ha descrito este aumento en el perfil respirométrico (Anderlei y Büchs, 2001) como una respuesta al consumo secuencial de sustratos. Sin embargo, en el caso de la presencia de diauxia, el aumento en la VTO no es mayor al valor de VTO_{max} alcanzado al principio del cultivo, por lo que no explicaría el aumento de la VTO observado en los cultivos de las cepas ATCC9046 y OP AlgU+. Otra explicación al aumento en la VTO, son los cambios en la reología del medio. Giese et al (2014), reportaron que un aumento en la viscosidad del

medio incrementa la VTO, debido a la formación de películas en la pared del matraz que reflejan un incremento en el suministro de oxígeno.

En la Figura 7.1b se muestran los perfiles respirométricos de los cultivos desarrollados en la condición de baja transferencia para las tres cepas. Se observa que para los cultivos de las tres cepas se alcanzó una VTO_{max} de $1.9 \text{ mmolL}^{-1}\text{h}^{-1}$ al inicio del cultivo. En los cultivos de la cepa GG9 la VTO_{max} se mantuvo durante todo el cultivo, por lo que se encontró en limitación de oxígeno. Para el caso de la cepa OP AlgU+, a las 50 horas se observó un aumento de la VTO, alcanzando un valor de $2.1 \text{ mmolL}^{-1}\text{h}^{-1}$, sin embargo, con respecto a la media obtenida durante el cultivo, este incremento no fue significativo. La cepa ATCC9046 presentó un aumento significativo de la VTO a las 65 horas, alcanzando un valor de $2.7 \text{ mmolL}^{-1}\text{h}^{-1}$, posteriormente a las 85 horas comenzó la disminución de la VTO, dando así el final del cultivo. En el caso de los cultivos de las cepas OP AlgU+ y GG9, no se observó una disminución de la VTO, por lo que se puede deducir que las células aún se encontraban activas.

En estos resultados se observaron claramente las diferencias en las tendencias de los perfiles respirométricos de los cultivos de las tres cepas, bajo las dos condiciones de VTO evaluadas. En la condición de alta transferencia, en donde se presentaron aumentos significativos en la VTO, y que posiblemente se debieron a cambios en la reología del medio. En contraste, en la condición de baja transferencia, en los cultivos de las cepas mutantes, se observó que estuvieron limitados de oxígeno durante todo el cultivo y no presenta una disminución de la VTO. En contraste, en los cultivos de la cepa ATCC9046 (cepa control), si se presentaron cambios significativos de la VTO, aún en la condición de baja transferencia.

7.2 Consumo de potencia

En la Figura 7.2a se presenta el perfil de consumo de potencia (P/V) para los cultivos de las tres cepas, en la condición de alta transferencia. Se observa que para los cultivos de la cepa ATCC9046 se alcanzó un consumo de P/V máximo de 1.3 kWm^{-3} a las 72 horas del cultivo, sin embargo, durante el cultivo se observaron dos regiones de consumo: la primera región durante las primeras 40 horas de cultivo, con un incremento mínimo, pasando de una P/V de 0.2 kWm^{-3} a 0.6 kWm^{-3} y la segunda región comenzó a partir de la 40 horas hasta las 60 horas, en donde presentó el mayor incremento de consumo de P/V, de 0.6 kWm^{-3} a 1.3 kWm^{-3} . Este incremento en la segunda etapa del cultivo podría deberse a los cambios en la reología del

medio, ya que el incremento en la viscosidad se ve reflejado en un mayor consumo de potencia (Büchs et al., 2000a).

En los cultivos de las cepas OP AlgU+ y GG9 desarrollados en la condición de alta transferencia, se observó un consumo de potencia máximo de 1 kWm^{-3} . A pesar de que los cultivos de las cepas mutantes de *A. vinelandii* (OP AlgU+ y GG9) alcanzaron valores similares de consumo de potencia máxima, se observaron perfiles diferentes durante el cultivo. La cepa OP AlgU+ presentó consumos de potencia mayores que la GG9 a partir de las 20 horas con un incremento lineal hasta las 55 h, en contraste, en los cultivos de la cepa GG9, se observaron dos etapas como las descritas para la cepa ATCC9046.

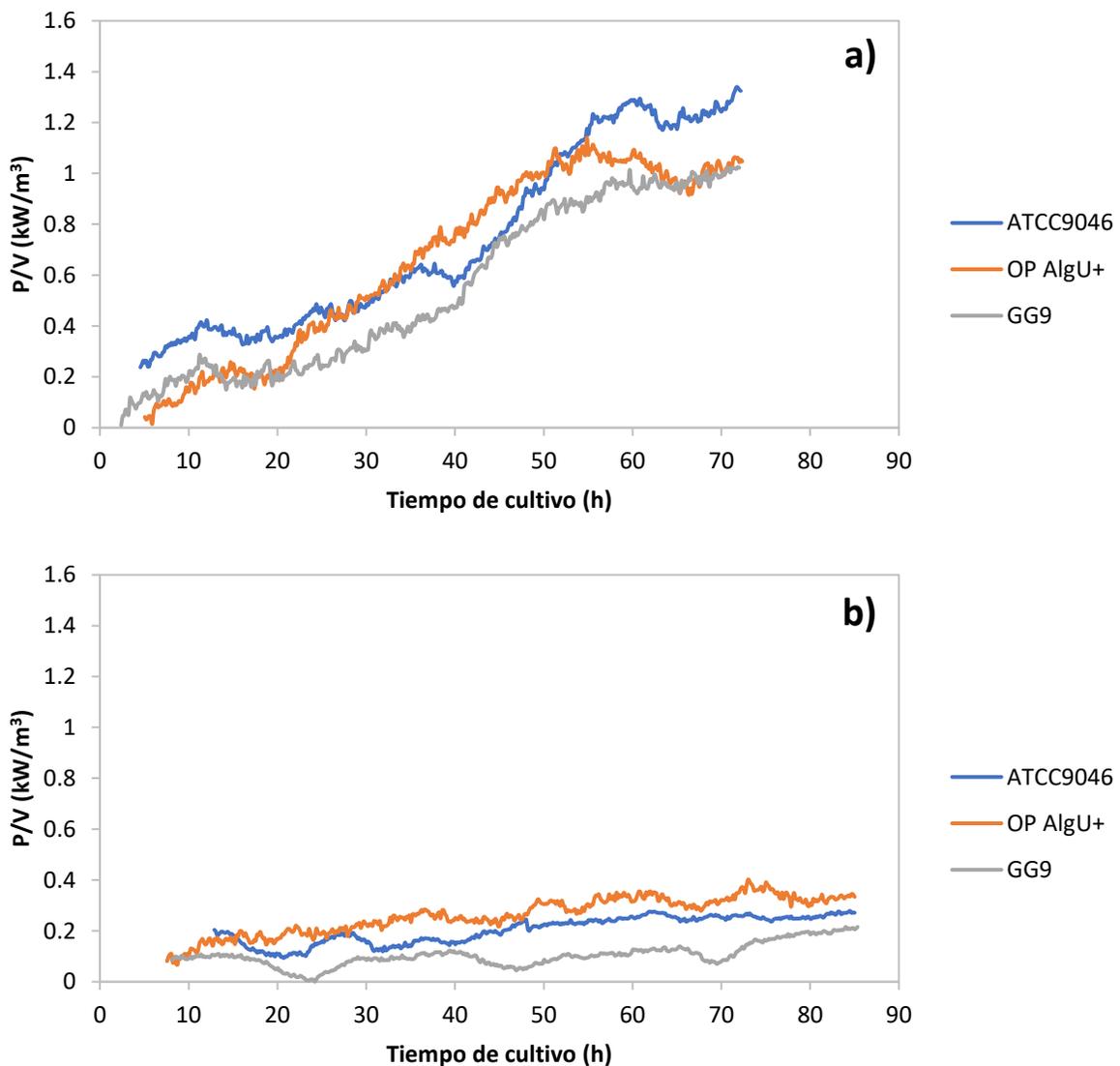


Figura 7.2. Evolución del consumo de potencia en las cepas de *A. vinelandii* ATCC9046, OP AlgU+ y GG9. a) alta transferencia, b) baja transferencia.

Para la condición de baja transferencia, se muestran los perfiles en la Figura 7.2b, los cultivos de las tres cepas presentaron un comportamiento lineal. Los valores de consumo de potencia máximos fueron de 0.27, 0.33 y 0.20 kWm⁻³, para las cepas ATCC9046, OP AlgU+ y GG9, respectivamente. La disminución del consumo de potencia respecto a la condición de alta transferencia, podría deberse al cambio en los parámetros operacionales, como lo describió Büchs, et al (2000a), quienes reportaron que al aumentar el volumen de llenado, se observaba una disminución en el consumo de potencia, debido a que la fricción entre el líquido y el matraz, no aumenta con respecto al aumento en el volumen de llenado.

7.3 Análisis reológico del caldo de cultivo y capacidad viscosificante del alginato de las cepas de *A. vinelandii* ATCC9046, OP AlgU+ y GG9.

La evolución de la viscosidad aparente (η ; a una velocidad de corte de 300 s⁻¹) del caldo de cultivo en la condición de alta transferencia se muestra en la Figura 7.3a. Para los cultivos de la cepa control (ATCC9046), se alcanzó una viscosidad máxima de 29.2 ± 1.2 mPa.s, siendo el valor más alto obtenido. Mientras que para las cepas OP AlgU+ y GG9, se obtuvieron viscosidades aparentes máximas de 22.9 ± 0.1 mPa.s y 25.7 ± 0.6 mPa.s, respectivamente. Cabe destacar que en los cultivos de la cepa OP AlgU+ a las 48 horas, ya se había alcanzado una viscosidad de 20mPa.s, mientras que en los cultivos de las otras dos cepas, a ese tiempo de cultivo la viscosidad aparente era de alrededor de 10 mPa.s. Además, el aumento de la viscosidad de la cepa OP AlgU+, ocurrió en el intervalo de las 36 - 48 horas, correlacionando con el aumento de la VTO. Adicionalmente, en la cepa ATCC9046 también se observó que el aumento de la VTO correlacionó con el aumento en la viscosidad de las 48 horas hasta las 72 horas.

Así mismo, los cambios en la viscosidad presentaron una relación muy estrecha con los perfiles de consumo de potencia; en los cultivos en los que se observaba un aumento en la viscosidad, se reflejó en un aumento en el consumo de potencia, tal y como lo reportó Büchs et al., (2000B).

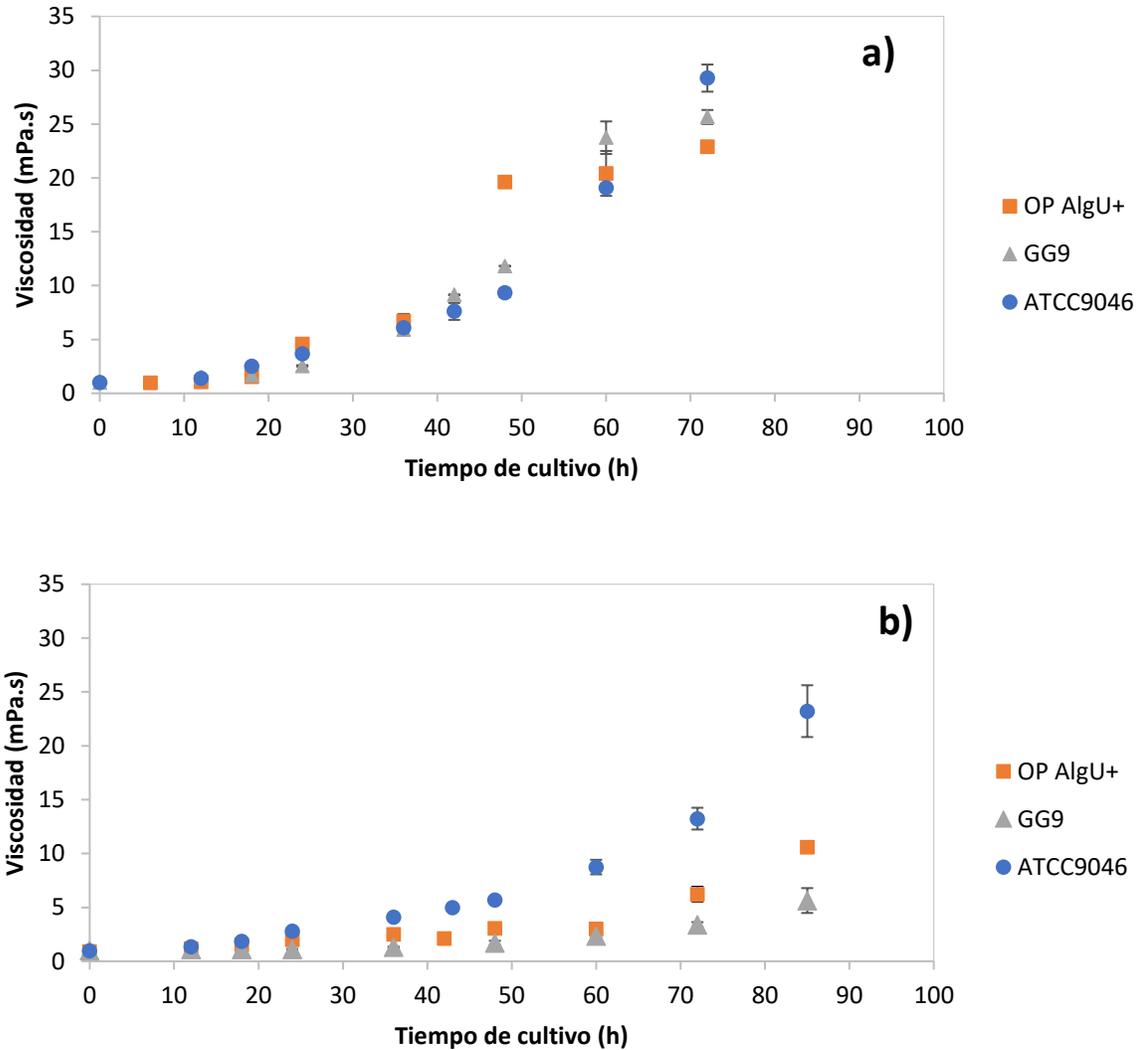


Figura 7.3. Viscosidad aparente del caldo de cultivo en las cepas de *A. vinelandii* ATCC9046, OP AlgU+ y GG9. a) alta transferencia, b) baja transferencia. A una velocidad de corte igual a 300 s^{-1} .

En la Figura 7.3b, se presenta la evolución de la viscosidad del caldo de cultivo en la condición de baja transferencia. En esta se observa que la viscosidad de los caldos de cultivos de la cepa ATCC9046 alcanzó un valor máximo de 23 mPa.s. Sin embargo, las viscosidades de los caldos de cultivo de las cepas OP AlgU+ y GG9 alcanzaron valores de 10 mPa.s y 5 mPa.s respectivamente. Contrario a lo reportado con la cepa silvestre ATCC9046, la viscosidad de los cultivos de las cepas mutantes disminuyó en la condición de baja transferencia.

La viscosidad del medio de cultivo depende tanto de la concentración del polímero, como de sus propiedades químicas, por lo que más adelante se muestran la cuantificación del alginato

y su peso molecular, y como se comportaron las cepas en los cultivos desarrollados bajo las dos diferentes condiciones de VTO.

La capacidad viscosificante (CV) es un parámetro que indica la capacidad de inducir viscosidad del alginato. Esta se calcula graficando la concentración de alginato con respecto a la viscosidad aparente de los caldos de cultivo, en los diferentes puntos del cultivo, y posteriormente ajustando a un modelo exponencial en donde el exponente es la CV.

Estos valores se muestran en la Figura 7.4. Para la condición de alta transferencia (Fig. 7.4a), se observa que la CV en los cultivos de la cepa ATC9046, se obtuvo una CV de 0.95, mientras que para las cepas OP AlgU+ y GG9, se obtuvieron valores de 0.81 y 0.77, respectivamente. Valores altos de CV, indican que se necesita una concentración menor de alginato para llegar a viscosidades altas. Por lo tanto para la para las cepas OP AlgU+ y GG9, se necesita una mayor cantidad de alginato, para obtener viscosidades similares a los de la cepa ATCC9046.

Para la condición de baja transferencia, los perfiles se muestran en la Figura 7.4b. Se observa que para los cultivos de la cepa ATCC9046 se mantuvo la CV, con un valor de 0.96, mientras que para las cepas OP AlgU+ y GG9 los valores disminuyeron a 0.37 y 0.25 respectivamente.

La CV del alginato se ve afectado principalmente por sus propiedades químicas como es el peso molecular. Se observó que las bajas viscosidades aparentes de los caldos de cultivo de las cepas mutantes, dieron como resultado valores bajos de capacidad viscosificante.

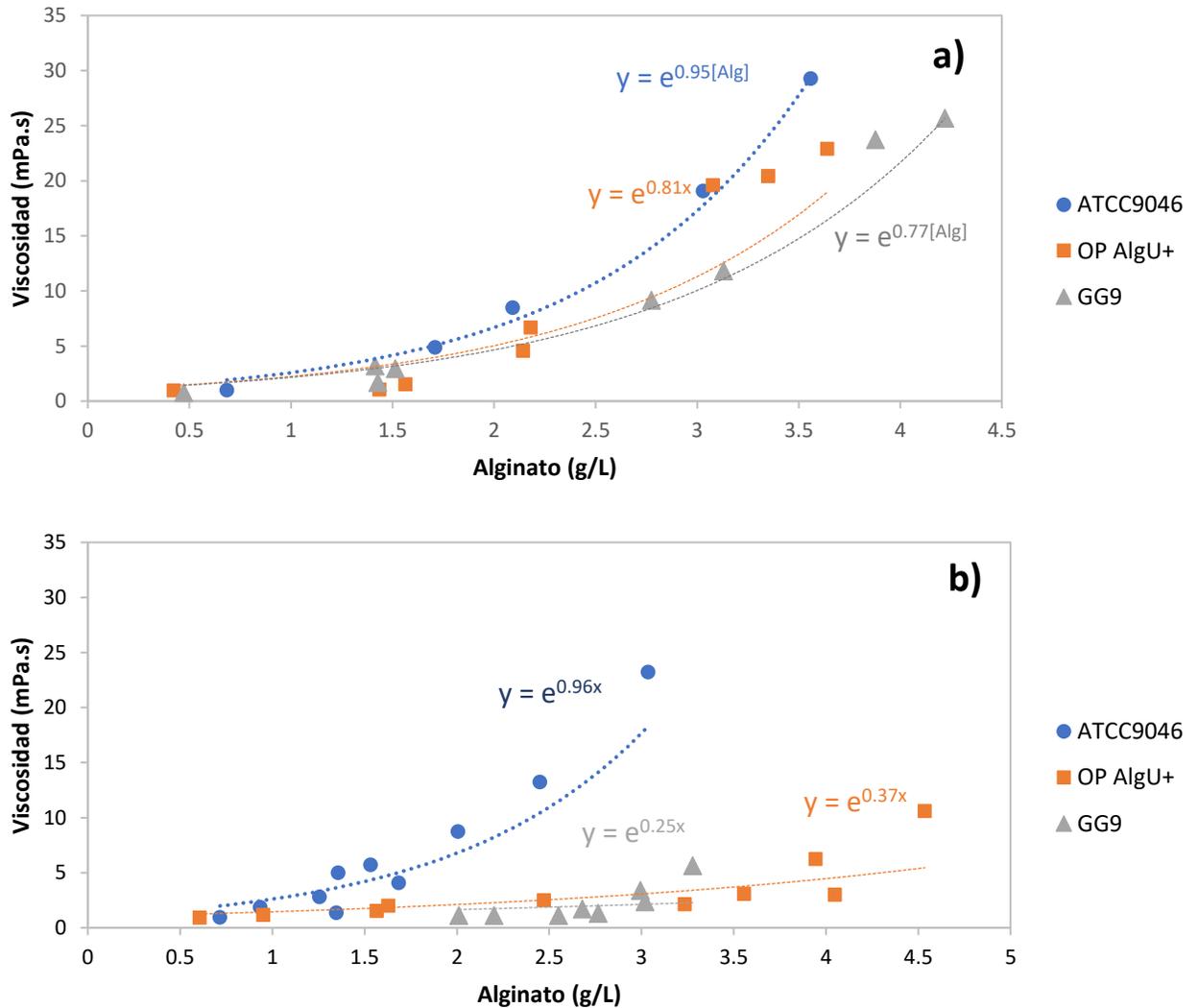


Figura 7.4. Capacidad viscosificante del alginato producido por las cepas de *A. vinelandii* ATCC9046, OP AlgU+ y GG9. a) alta transferencia, b) baja transferencia.

7.4 Análisis de la producción y del peso molecular del alginato producido por las cepas de *A. vinelandii* ATCC9046, OP AlgU+ y GG9.

Las cinéticas de producción de alginato, se presentan en la Figura 7.5. Para la condición de alta transferencia (Fig. 7.5a), se observa que en los cultivos de las tres cepas se alcanzaron concentraciones de alginato al final del cultivo similares ($3.6 \pm 0.6 \text{ gL}^{-1}$, $3.6 \pm 0.2 \text{ gL}^{-1}$ y $4.2 \pm 0.7 \text{ gL}^{-1}$ para las cepas ATCC9046, OP AlgU+ y GG9, respectivamente). Así mismo, se determinaron las productividades volumétricas del alginato, las cuales para las tres cepas fueron similares con valores de 0.05 y $0.06 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ (Tabla 7.1).

Como se había mencionado antes, la viscosidad del caldo de cultivo y la capacidad viscosificante se ven afectados por diversos factores, uno de ellos es la concentración de alginato. Sin embargo como se observó la concentración de alginato en los cultivos de las tres cepas no presentaron diferencias significativas, por lo que las diferencias en los valores de la viscosidad aparente se podrían deber a las características químicas del alginato, específicamente el peso molecular.

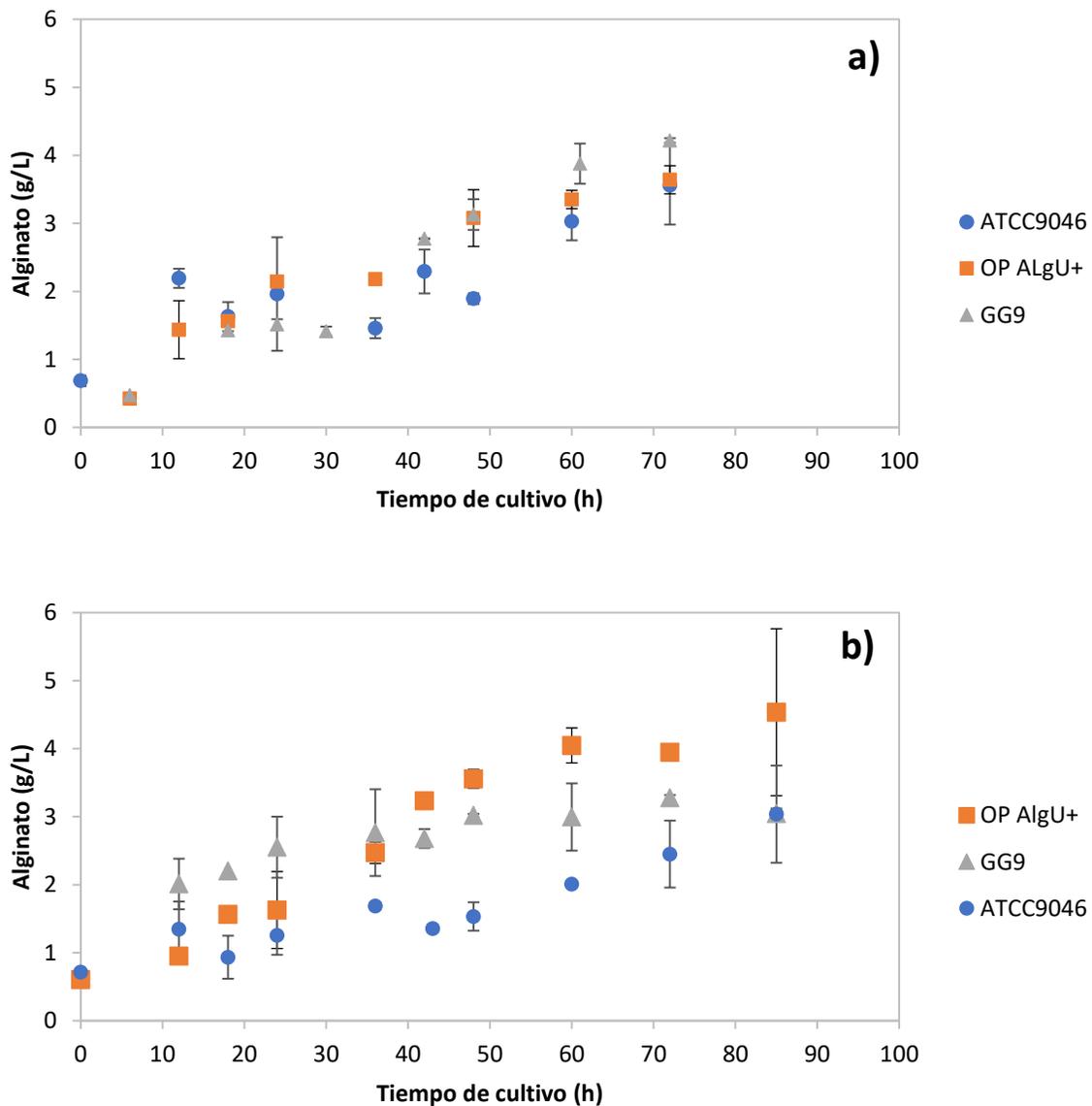


Figura 7.5: Producción de alginato en los caldos de cultivo de las cepas de *A. vinelandii* ATCC9046, OP AlgU+ y GG9. a) alta transferencia, b) baja transferencia.

Para la condición de baja transferencia (Fig. 7.4b) se observa que en los cultivos de la cepa ATCC9046, la producción de alginato es menor en comparación a las otras dos cepas, alcanzando una concentración máxima de $3.0 \pm 0.7 \text{ gL}^{-1}$ a las 85 horas de cultivo y una productividad de $0.04 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ (Tabla 7.2).

En el caso de los cultivos de las cepas OP AlgU+ y GG9, la producción de alginato presenta una tendencia lineal durante todo el cultivo, no asociada al crecimiento, alcanzando una concentración final de alginato de $4.5 \pm 1.2 \text{ gL}^{-1}$ y $3.3 \pm 0.1 \text{ gL}^{-1}$ y una productividad de $0.05 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ y 0.04 gL^{-1} , respectivamente.

Cabe destacar que en los cultivos de la cepa GG9, al inicio del cultivo se obtuvo una concentración de alginato de más del doble que en las otras dos cepas, sin embargo durante el cultivo el aumento fue mínimo comparado con la producción de alginato en los cultivos de la cepa OP AlgU+ y ATCC9046. Además, al final de los cultivos de las tres cepas se alcanzaron concentraciones de alginato similares, por lo que las diferencias observadas en las viscosidades aparentes, no se pueden explicar con la concentración de alginato, si no al igual que, en la condición de alta transferencia podrían explicarse por cambios en la composición química del polímero.

Peso molecular

La evolución de los pesos moleculares promedio (PMP), se presenta en la Figura 7.6. Para los alginatos sintetizados en la condición de alta transferencia (Fig. 7.6a), se observa que las tres cepas tienen perfiles diferentes. En el caso de los cultivos de la cepa ATCC9046, se observó que, a partir de las 18 horas, el alginato era de alto peso molecular, cercano a los 2000 kDa; y este permaneció constante durante el resto del cultivo, con un PMP máximo de $2162 \pm 204 \text{ kDa}$.

Para los cultivos de la cepa OP AlgU+, se observaron tres zonas; la primera abarcó el inicio del cultivo hasta las 36 horas, en donde el PMP fue de 800 kDa. En la segunda zona se observó un incremento del PMP del alginato de las 36 a las 48 horas, alcanzando un valor de 1800 kDa (se duplicó el PMP en 12 horas) y en la tercera zona se observó un incremento gradual dando como resultado un peso molecular promedio máximo de $2132 \pm 220 \text{ kDa}$ al final del cultivo.

7. Resultados y discusión

Se debe resaltar que, se observó una clara correlación entre el aumento de la viscosidad del caldo de cultivo, que ocurre entre las 36 a las 48 horas, y el aumento del peso molecular que se presentó en ese periodo de tiempo.

En el caso de los cultivos de la cepa GG9, se observó un incremento lineal del PMP durante todo el cultivo, hasta alcanzar un valor máximo de 2467 ± 606 kDa.

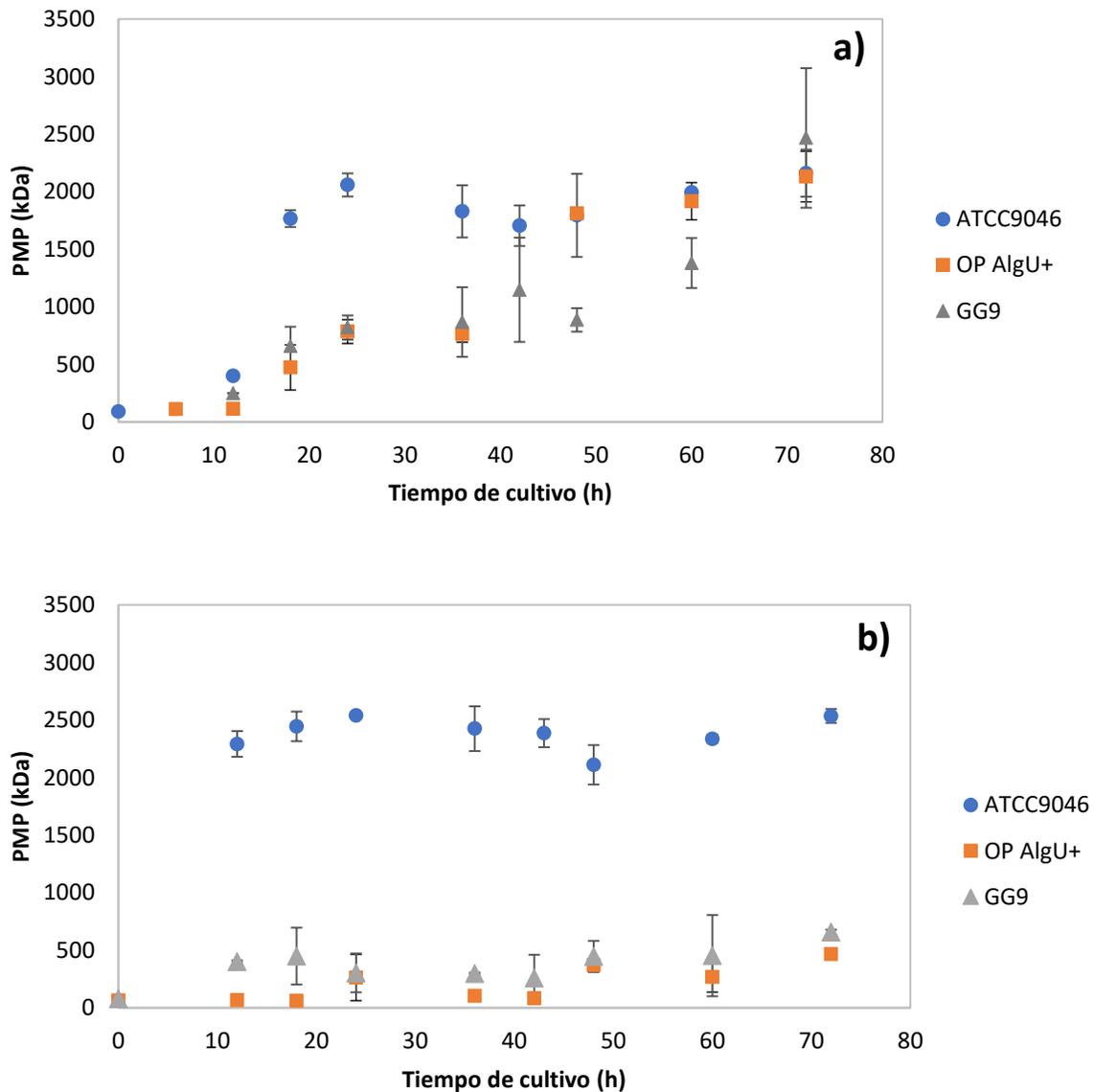


Figura 7.6: Evolución del peso molecular del alginato producido por las cepas de *A. vinelandii* ATCC9046, OP AlgU+ y GG9. a) alta transferencia. b) baja transferencia.

A pesar de que no hubo diferencias significativas en las concentraciones de alginato y sus pesos moleculares promedio, los caldos de cultivo de la cepa ATCC9046 fueron en los que se obtuvo una mayor viscosidad aparente y una mayor capacidad viscosificante, en comparación con los caldos de cultivo de las cepas OP AlgU+ y GG9, lo que sugiere que otros factores como la relación M/G y/o el grado de acetilación, podrían ser los responsables de las diferencias encontradas en la viscosidad aparente y la capacidad viscosificante, entre los caldos de cultivo de las tres cepas.

Para la condición de baja transferencia (Fig. 7.6b), se observó que en los cultivos de la cepa ATCC9046 el PMP desde el inicio del cultivo fue superior a los 2000 kDa y durante todo el cultivo se mantuvo constante, alcanzando un PMP máximo de 2535 ± 60 kDa. Este comportamiento del alginato sintetizado por la cepa ATCC9046 en función de la VTO, ya se había reportado en el trabajo de Gómez-Pazarín et al., (2015).

En contraste, en los cultivos de la cepa OP AlgU+, se observó que durante las primeras 42 horas de cultivo, el peso molecular promedio del alginato tenía un valor de 100 kDa, sin observarse un incremento significativo. Posteriormente, durante las últimas 30 horas, se observó un aumento en el peso molecular promedio del alginato, hasta alcanzar un PMP máximo de 467 ± 12 kDa.

En el caso de los cultivos de la cepa GG9, durante todo el cultivo el peso molecular del alginato sintetizado por esta cepa fue cercano a los 500 kDa, alcanzándose al final un PMP promedio máximo de 656 ± 22 kDa. Estos resultados contrastan con lo que se había reportado en los cultivos de la cepa ATCC9046, en los que una disminución en la velocidad de transferencia de oxígeno, afectaba positivamente el PMP del alginato (Flores et al, Gómez-Pazarín et al., 2015; Peña et al., 2011).

Sin embargo, los bajos pesos moleculares del alginato producido por las cepas mutantes, en la condición de baja transferencia se relacionan con las bajas viscosidades en los caldos de cultivo de estas cepas en la condición de baja transferencia.

Con la finalidad de entender como evolucionaron los pesos moleculares de los alginatos sintetizados por las tres cepas, bajo las dos condiciones de cultivo, se realizaron las distribuciones del peso molecular del alginato, que se muestran en la Figura 7.7.

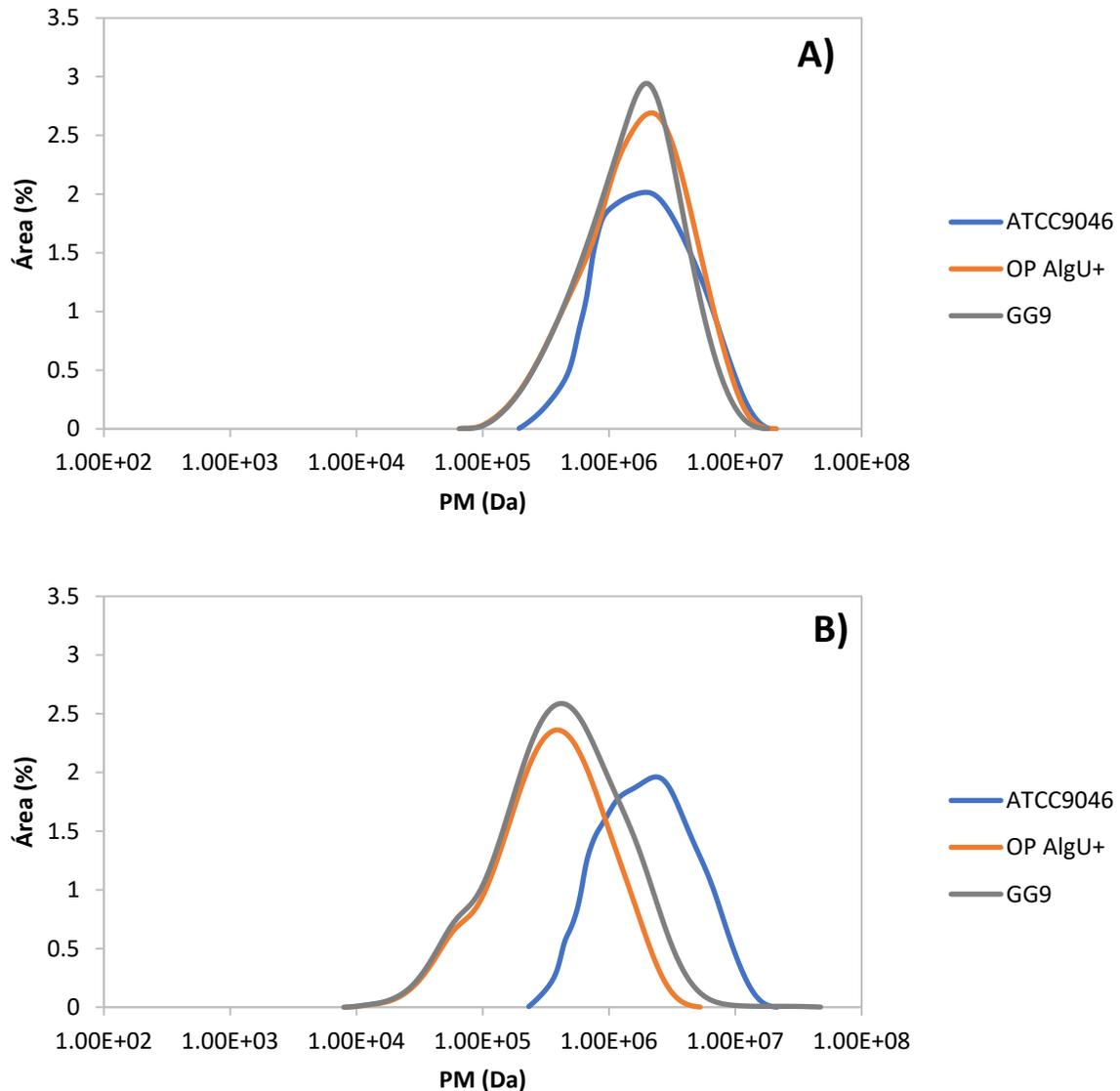


Figura 7.7: Distribución del peso molecular del alginato a las 72 horas producido por las cepas de *A. vinelandii* ATCC9046, OP AlgU+ y GG9. a) alta transferencia, b) baja transferencia.

Para la condición de alta transferencia (Fig. 7.7a), se observó que para los cultivos de las tres cepas, ATCC9046, OP AlgU+ y GG9, las distribuciones de peso molecular del alginato fueron muy similares, con pesos moleculares que van desde $1.0e^5$ Da a $1.0e^7$ Da. En contraste, para la condición de baja transferencia se observó una clara diferencia en la distribución de los pesos moleculares de los alginatos sintetizados por las cepas OP AlgU+ y GG9 en comparación con los alginatos sintetizados por la cepa ATCC9046. Mientras que, los alginatos sintetizados por la cepa control abarca pesos moleculares de entre $1.0e^5$ Da y $1.0e^7$ Da, los pesos moleculares de los alginatos sintetizados por las cepas OP AlgU+ y GG9 abarcan entre

$1.0e^4$ Da y $1.0e^7$ Da, la diferencia en el incremento de las familias de alginato de muy bajo peso molecular, se reflejó en una disminución de los pesos moleculares promedio de estas cepas, con respecto a la condición de alta transferencia.

Cabe destacar que es la primera vez que se midieron los pesos moleculares de la cepa OP AlgU+, en estas condiciones, por lo que no se tiene una explicación a los bajos pesos moleculares obtenidos en baja transferencia. Por otro lado para la cepa GG9, ya se había reportado un aumento en el peso molecular, al disminuir la velocidad de transferencia, sin embargo los experimentos se realizaron en condiciones de diazotrofia en donde el metabolismo de *A. vinelandii* es completamente diferente al que se presenta en condiciones donde tiene una fuente de nitrógeno.

Cabe mencionar que los alginatos sintetizados en los cultivos de la cepa GG9, también presentaron familias de alto peso molecular. En este sentido Ahumada-Manuel et al., (2017) reportó para la cepa GG9 un aumento en la expresión de los genes *alg8* y *algD*, encargados de la polimerización, así como un aumento en el gen *algL* (alginato liasa).

Una teoría es que en la condición de baja transferencia el alginato liasa se encuentre más activo que las polimerasas, y debido a esto se presentaron familias de muy bajo peso molecular, en contraste con la cepa ATCC9046.

Tabla 7.1. Resumen de datos de productividad, concentración máxima de alginato y PMP máximo de las cepas de *A. vinelandii* ATCC9046, OP AlgU+ y GG9, en alta (AT) y baja (BT) transferencia.

CEPA	q_{Alg} (g L ⁻¹ h ⁻¹)		Alg_{max} (g L ⁻¹)		PMP_{max}	
	AT	BT	AT	BT	AT	BT
ATCC9046	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.01	3.56 ± 0.58	3.04 ± 0.71	2162 ± 204	2535 ± 60
OP AlgU+	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.00	3.64 ± 0.21	4.54 ± 1.23	2132 ± 220	467 ± 12
GG9	0.06 ± 0.01	0.04 ± 0.00	4.22 ± 0.68	3.28 ± 0.04	2467 ± 606	656 ± 22

7.5 Cinéticas de crecimiento y consumo de sustrato de las cepas de *A. vinelandii* ATCC9046, OP AlgU+ y GG9.

La evolución de la concentración de biomasa, para las dos condiciones de transferencia de oxígeno, se muestran en la Figura 7.8. Las cepas ATCC9046 y OP AlgU+ en la condición de alta transferencia (Fig. 7.8a), presentaron un crecimiento exponencial, alcanzando una concentración máxima de biomasa a las 72 horas del cultivo de 4.84 ± 0.12 y 4.90 ± 0.37 gL^{-1} respectivamente.

En el caso de la cepa GG9, esta alcanzó una mayor concentración de biomasa con respecto a las otras dos cepas, obteniendo una concentración de biomasa máxima de 6.50 ± 0.17 gL^{-1} al final del cultivo. Se obtuvieron velocidades de crecimiento específico (μ) similares para las tres cepas, con valores de 0.10 ± 0.00 h^{-1} , 0.13 ± 0.01 h^{-1} y 0.12 ± 0.01 h^{-1} para la cepa ATCC9046, OP AlgU+ y GG9, respectivamente (Tabla 7.2).

Para la condición de baja transferencia (Fig. 7.8b), se obtuvo un valor máximo de biomasa de 4.12 ± 0.06 gL^{-1} para los cultivos de la cepa ATCC9046, en contraste, para los cultivos de las cepas OP AlgU+ y GG9 se obtuvieron concentraciones de 3.40 ± 0.22 gL^{-1} y 3.56 ± 0.12 gL^{-1} , respectivamente. Así mismo, las velocidades de crecimiento específico para esta condición, fueron de 0.09 ± 0.00 h^{-1} , 0.05 ± 0.00 h^{-1} y 0.08 ± 0.00 h^{-1} , para las cepas ATCC9046, OP AlgU+ y GG9, respectivamente (Tabla 7.3). En esta condición la cepa ATCC9046 obtuvo el valor más alto de biomasa.

Comparando los resultados obtenidos en ambas condiciones, observamos claramente las diferencias en el crecimiento y acumulación de biomasa de las cepas en función de la velocidad de transferencia de oxígeno. Como se ha reportado anteriormente en la condición de alta transferencia se obtuvieron las concentraciones de biomasa más alta, alcanzando valores entre 5 y 6 gL^{-1} , en contraste, en la condición de baja transferencia, las concentraciones de biomasa alcanzaron valores entre 3 - 4 gL^{-1} . En lo que se refiere a las velocidades de crecimiento, en los cultivos de la cepa ATCC9046 los valores fueron similares en ambas condiciones, mientras que en los cultivos de las cepas OP AlgU+ y GG9 se obtuvieron valores de μ menores en la condición de baja transferencia. Cabe destacar que, en los cultivos de la cepa OP AlgU+ desarrollados en la condición de baja transferencia se obtuvo un valor de μ menor (50%) que en la condición de alta transferencia.

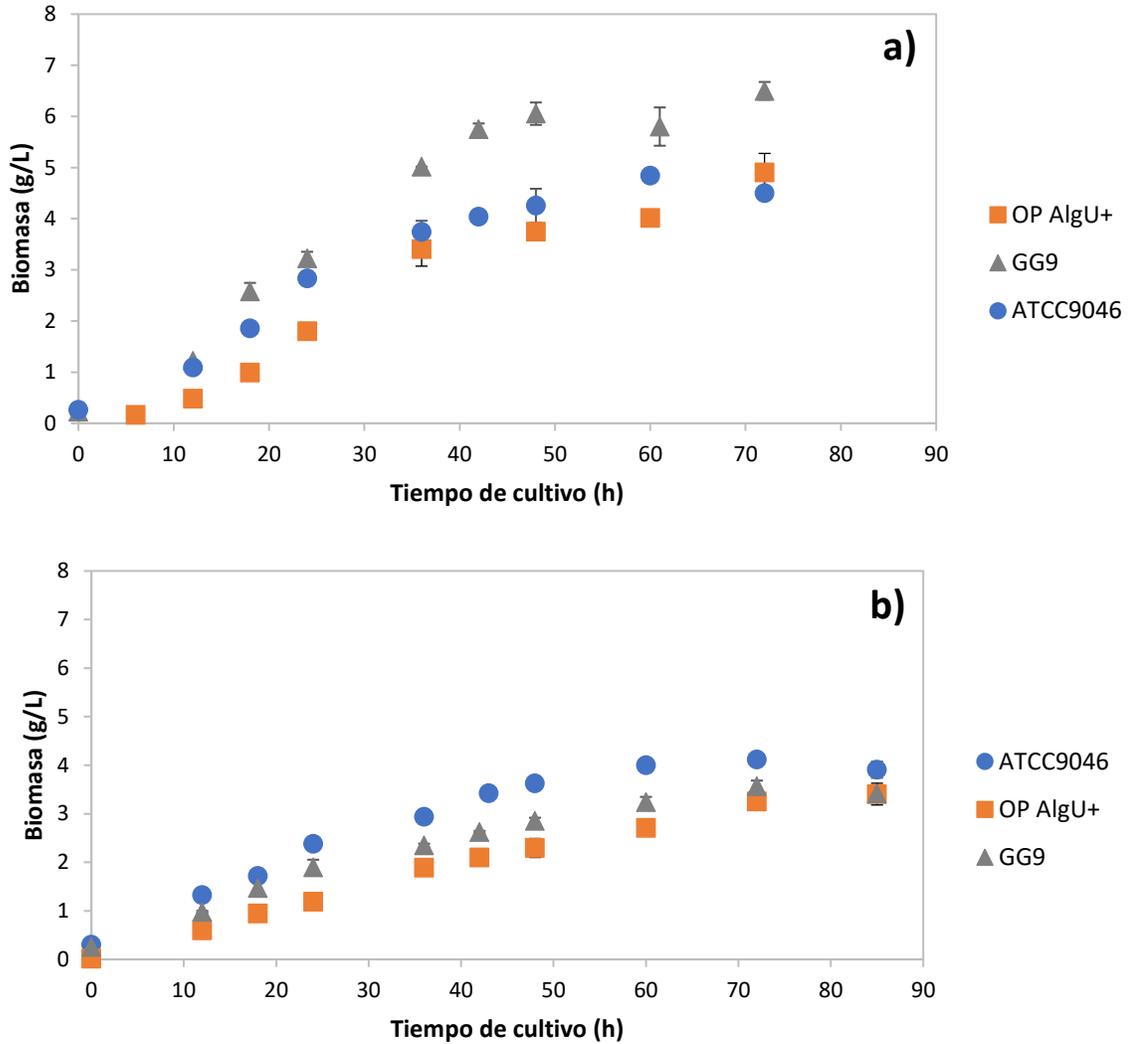


Figura 7.8. Cinética de crecimiento de las cepas de *A. vinelandii* ATCC9046, OP AlgU+ y GG9. a) alta transferencia, b) baja transferencia.

El consumo de sacarosa se muestra en la Figura 7.9, para la condición de alta transferencia (Fig. 7.9a), se observó que los cultivos de las tres cepas presentaron un perfil de consumo de sustrato similar, obteniéndose valores de sacarosa residual de $1.90 \pm 0.24 \text{ g L}^{-1}$, $4.35 \pm 0.30 \text{ g L}^{-1}$ y $1.24 \pm 0.047 \text{ g L}^{-1}$, para los cultivos de las cepas ATCC9046, OP AlgU+ y GG9, respectivamente.

Los rendimientos que se obtuvieron de la biomasa con respecto al consumo de sacarosa para los cultivos de las tres cepas fueron similares, con valores de $0.24 \pm 0.01 \text{ g g}^{-1}$, $0.22 \pm 0.00 \text{ g g}^{-1}$ y $0.28 \pm 0.04 \text{ g g}^{-1}$ para las cepas ATCC9046, OP AlgU+ y GG9, respectivamente, no observándose diferencias significativas (Tabla 7.2).

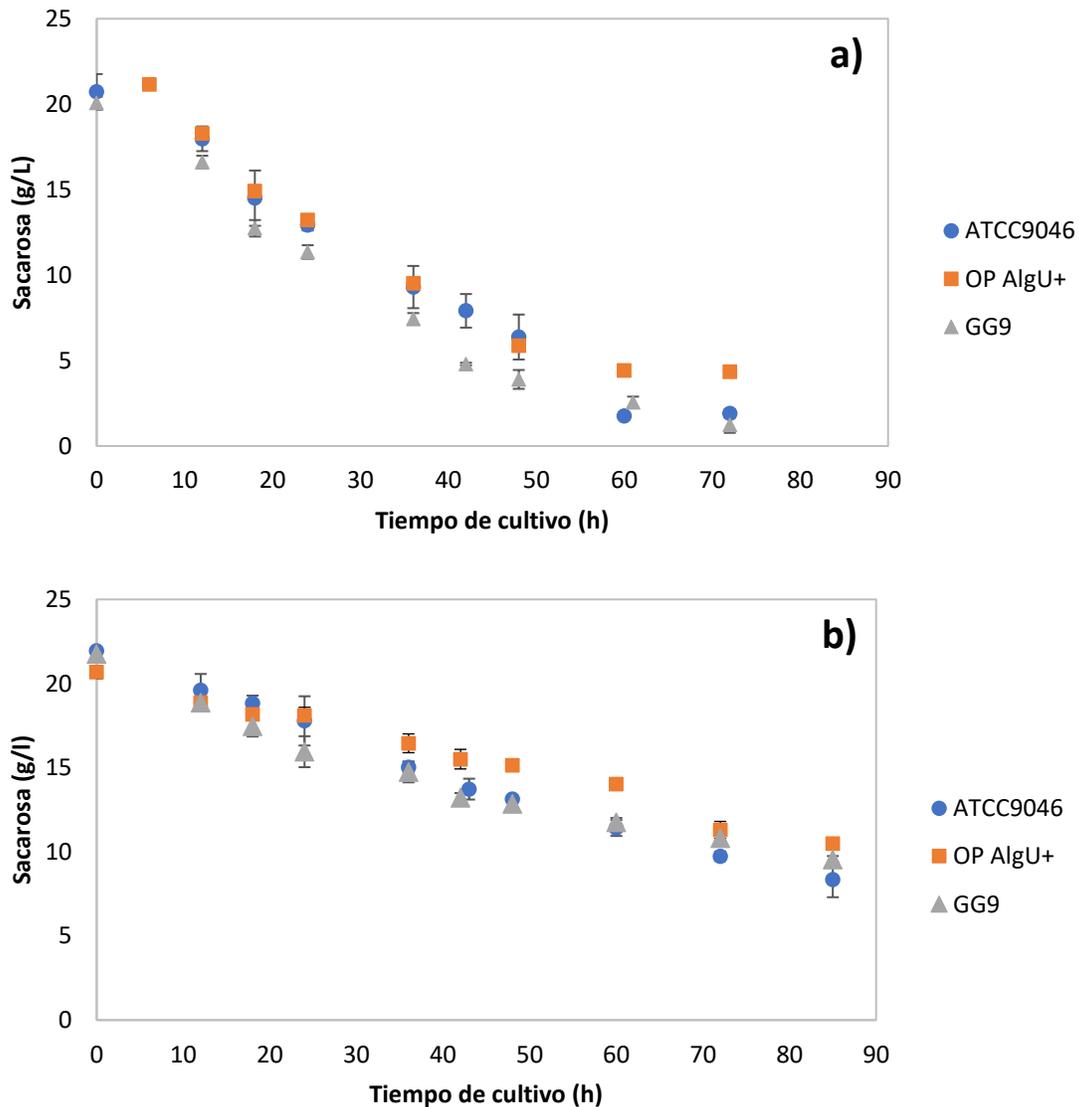


Figura 7.9. Consumo de sacarosa de las cepas de *A. vinelandii* ATCC9046, OP AlgU+ y GG9. a) alta transferencia, b) baja transferencia.

De forma similar, en la condición de baja transferencia (Fig. 7.9b), se observó que en los cultivos de las tres cepas los perfiles de consumo de sustrato fueron similares, dando valores de sacarosa residual de $8.35 \pm 1.05 \text{ gL}^{-1}$, $10.48 \pm 0.16 \text{ gL}^{-1}$ y $9.54 \pm 0.20 \text{ gL}^{-1}$ para las cepas ATCC9046, OP AlgU+ y GG9, respectivamente. Así mismo, se determinaron los rendimientos de la biomasa respecto al consumo de sustrato, en donde se obtuvieron valores de $0.29 \pm 0.04 \text{ gg}^{-1}$, $0.33 \pm 0.02 \text{ gg}^{-1}$, $0.28 \pm 0.01 \text{ gg}^{-1}$, para las cepas ATCC9046, OP AlgU+ y GG9 respectivamente (Tabla 7.3).

Las diferencias en el consumo de sacarosa entre los cultivos de las tres cepas desarrollados bajo las dos condiciones de transferencia de oxígeno son notables, mientras que en la condición de alta transferencia las tres cepas llegaron a consumir casi totalmente la sacarosa, en la condición de baja transferencia, solo consumió el 50% de la sacarosa.

Los rendimientos de biomasa en los cultivos de las cepas ATCC9046 y GG9 no presentaron diferencias significativas en ambas condiciones, mientras que la cepa OP AlgU+ presentó un mayor rendimiento en la condición de baja transferencia, además de presentar la menor velocidad de crecimiento específico.

Tabla 7.2. Tabla comparativa de los parámetros cinéticos de las cepas de *A. vinelandii* ATCC9046, OP AlgU+ y GG9 en alta transferencia.

Cepa	$Y_{x/s}$ ($g\ g^{-1}$)	$Y_{Alg/x}$ ($g\ g^{-1}$)	μ (h^{-1})	X_{max} ($g\ L^{-1}$)
ATCC9046	0.24 ± 0.01	0.79 ± 0.14	0.10 ± 0.00	4.84 ± 0.12
OP AlgU+	0.22 ± 0.00	0.71 ± 0.05	0.13 ± 0.01	4.90 ± 0.37
GG9	0.28 ± 0.04	0.75 ± 0.15	0.12 ± 0.01	6.50 ± 0.17

Tabla 7.3. Tabla comparativa de los parámetros cinéticos de las cepas de *A. vinelandii* ATCC9046, OP AlgU+ y GG9 en baja transferencia.

Cepa	$Y_{x/s}$ ($g\ g^{-1}$)	$Y_{Alg/x}$ ($g\ g^{-1}$)	μ (h^{-1})	X_{max} ($g\ L^{-1}$)
ATCC9046	0.29 ± 0.04	0.78 ± 0.20	0.09 ± 0.00	4.12 ± 0.06
OP AlgU+	0.33 ± 0.02	0.98 ± 0.12	0.05 ± 0.00	3.40 ± 0.22
GG9	0.28 ± 0.01	0.92 ± 0.04	0.08 ± 0.00	3.56 ± 0.12

8. CONCLUSIONES

- Independientemente de las cepas en la condición de alta transferencia ($\approx 6 \text{ mmolL}^{-1}\text{h}^{-1}$) se obtuvo alginato de alto peso molecular ($> 2000 \text{ kDa}$).
- Bajo las dos condiciones de transferencia de oxígeno evaluadas, las viscosidades aparentes y capacidades viscosificantes más altas se obtuvieron en los cultivos de la cepa ATCC9046.
- En la condición de baja transferencia ($\approx 2 \text{ mmolL}^{-1}\text{h}^{-1}$), para las dos cepas de *A. vinelandii* OP AlgU+ y GG9 se obtuvo alginato de bajo peso molecular, además de una capacidad viscosificante baja, contrario a lo obtenido en la cepa control (ATCC9046).
- El bajo peso molecular promedio en la condición de baja transferencia para las cepas de *A. vinelandii* OP AlgU+ y GG9 podría deberse a la actividad de las depolimerasas, que debido a las modificaciones genéticas, sean más activas en condiciones de baja aireación.

9. REFERENCIAS

- Ahumada-Manuel, C., Guzmán, J., Peña, C., Quiroz-Rocha, E., Espín, G., Núñez, C. 2017. The signaling protein MucG negatively affects the production and the molecular mass of alginate in *Azotobacter vinelandii*. *Appl Microbiol Biot.* 101: 1521-1534.
- Anderlei, T., Büchs, J. 2001. Device for sterile online measurement of the oxygen transfer rate in shaking flasks. *Biochem Eng J.* 7: 157-162.
- Anderlei, T., Zang, W., Papaspyrou, M., Büchs, J. 2004. Online respiration activity measurement (OTR, CTR, RQ) in shake flasks. *Biochem Eng J.* 17: 187-194.
- Avendaño-Romero, G., López-Malo, A., Palou. 2013. Propiedades del alginato y aplicaciones en alimentos. *Temas selectos de Ingenieria de alimentos.* 7-1: 87-96.
- Büchs, J. 2001. Introduction to advantages and problems of shaken cultures. *Biochem Eng J.* 7: 91-98.
- Büchs, J., Lotter, S., Milbradt, C., 2001. Out-of-phase operating conditions, a hitherto unknown phenomenon in shaking bioreactors. *Biochem Eng J.* 7: 135-141.
- Büchs, J., Maier, U., Milbradt, C., Zoels, B. 2000a. Power consumption in shaking flasks on rotary shaking machines: I. Power consumption measurement in unbaffled flasks at low liquid viscosity. *Biotechnol Bioeng.* 68: 589-593.
- Büchs, J., Maier, U., Milbradt, C., Zoels, B. 2000b. Power consumption in shaking flasks on rotary shaking machines: ii. nondimensional description of specific power consumption and flow regimes in unbaffled flasks at elevated liquid viscosity. *Biotechnol Bioeng.* 68: 394-601.
- Castillo, T. 2013. La acetilación de los alginatos sintetizados por *Azotobacter vinelandii* en función de la tensión de oxígeno disuelto y de la velocidad específica de crecimiento. Tesis de Doctorado. Cuernavaca, Morelos. México.
- Castillo, T., Galindo, E., Peña, C. 2013. The acetylation degree of alginates in *Azotobacter vinelandii* ATCC9046 is determined by dissolved oxygen and specific growth rate: studies in glucose-limited chemostat cultivations. *J Ind Microbiol Biot.* 40: 715-723.
- Castillo, T., López, L., Flores, C., Segura, D., García, A., Galindo, E., Peña, C. 2018. Oxygen uptake rate in alginate producer (*algU+*) and nonproducer (*algU-*) strains of *Azotobacter vinelandii* under nitrogen-fixation conditions. *J Appl Microbiol.* 125: 181-189.
- Clementi, F. 1997. Alginate Production by *Azotobacter vinelandii*. *Critical Reviews in Biotechnology.* 17:4, 327-361.

- Díaz-Barrera, A., Peña, C., Galindo, E. 2007. The oxygen transfer rate influences the molecular mass of the alginate produced by *Azotobacter vinelandii*. *Appl Microbiol Biot.* 76: 903-910.
- Díaz-Barrera, A., Silva, P. Ávalos, R. 2009. Alginate molecular mass produced by *Azotobacter vinelandii* in response to changes of the O₂ transfer rate in chemostat cultures. *Biotechnol Lett.* 31: 825-829.
- Draget, K., Taylor, C. 2011. Chemical, physical and biological properties of alginate and their biomedical implications. *Food Hydrocolloid.* 25: 252-256.
- Flores, C., Díaz-Barrera, A., Martínez, F., Galindo, E., Peña, C. 2015. Role of oxygen in the polymerization and de-polymerization of alginate produced by *Azotobacter vinelandii*. *J Chem Technol Biot.* 90: 356-365.
- Flores, C., Moreno, S., Espín, G., Peña, C., Galindo, E. 2013. Expression of alginases and alginate polymerase genes in response to oxygen, and their relationship with the alginate molecular weight in *Azotobacter vinelandii*. *Enzyme Microb Tech.* 53: 85-91.
- Galindo, E., Peña, C., Núñez, C., Segura, D., Espín, G. 2007. Molecular and bioengineering strategies to improve alginate and polyhydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii*. *Microb Cell Fact.* 7:1-16.
- Giese, H., Azizan, A., Kümmel, A., Liao, A., Peter, C., Fonseca, J., Hermann, R., Duarte, T., Büchs, J. 2014. Liquid films on shake flask walls explain increasing maximum oxygen transfer capacities with elevating viscosity. *Biotechnol Bioeng.* 111. 295: 308.
- Gómez, K. 2014. Capacidad viscosificante del alginato producido por *Azotobacter vinelandii* en cultivos en matraces agitados sometidos a bajos consumos de potencia. Tesis de Maestría. Instituto de Biotecnología. UNAM.
- 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. *J Chem Technol Biot.* 91: 1485-1492.
- Lee, K., Mooney, D. Alginate: Properties and biomedical applications. 2012. *Prog Polym Sci.* 37: 106-126.
- López, I. 2018. Análisis de la velocidad de consumo específico de oxígeno en *Azotobacter vinelandii* bajo condiciones de fijación de nitrógeno: un estudio comparativo entre cepas productoras y no productoras de alginato. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería. UAEM.

- Maier, U., Büchs, J. 2001. Characterization of the gas-liquid mass transfer in shaking bioreactors. *Biocheml Eng J.* 7: 99-106.
- Martínez-Salazar, J., Moreno, S., Nájera, R., Boucher, J., Espín, G., Soberón-Chávez, G., Deretic, V. 1996. Characterization of the genes coding for the putative sigma factor AlgU and its regulators MucA, MucB, MucC, and MucD in *Azotobacter vinelandii* and evaluation of their roles in alginate biosynthesis. *J Bacteriol.* 178: 1800-1808.
- Noar, J., Bruno-Bárcena, J. 2018. *Azotobacter vinelandii*: the source of 100 years of discoveries and many more to come. *Microbiology.* 164: 421-436.
- Peña, C., Campos, N., Galindo, E. 1997. Changes in alginate molecular mass distributions, broth viscosity and morphology of *Azotobacter vinelandii* cultures in shake flasks. *Appl Microbiol Biot.* 48: 510-515.
- Peña, C., Galindo, E., Büchs, J. 2011. The viscosifying power, degree of acetylation and molecular mass of the alginate produced by *Azotobacter vinelandii* in shake flasks are determined by the oxygen transfer rate. *Process Biochem.* 46: 290-297.
- 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. *Lett Appl Microbiol.* 43: 200-204.
- Peña, C., Peter, Cyril., Büchs, J., Galindo, E. 2007. Evolution of the specific power consumption and oxygen transfer rate in alginate-producing cultures of *Azotobacter vinelandii* conducted in shake flasks. *Biochem Eng J.* 36: 73-80.
- Peña, C., Trujillo-Roldán, M., Galindo, E. 2000. Influence of dissolved oxygen tension and agitation speed on alginate production and its molecular weight in cultures of *Azotobacter vinelandii*. *Enzyme Microb Tech.* 27: 390-298.
- Pliego, M. 2014. Montaje, validacion y caracterización de un equipo para medir el consumo de potencia en línea en cultivos en matraces agitados. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería. UAEM.
- Sabra, W., Zeng, A., Deckwer, W. 2001. Bacterial alginate: Physiology, product quality and process aspects. *Appl Microbiol Biot.* 56: 315-325.
- Segura, D., Guzmán, J. Espín, G. 2003. *Azotobacter vinelandii* mutants overproduce poly- β -hydroxybutyrate or alginate. *Appl Microbiol Biot.* 63: 159-163.
- Trujillo-Roldán, M.A., Moreno, S., Segura, D., Galindo, E., Espín, G. 2003. Alginate production by an *Azotobacter vinelandii* mutant unable to produce alginate lyase. *Appl Microbiol Biot.* 60-733-737.

Urtuvia, V., Maturana, N., Acevedo, F., Peña, C., Díaz-Barrera, A. 2017. Bacterial alginate production: an overview of its biosynthesis and potential industrial production. *World J Microb Biot.* 33:198.

Van Suijdam, J., Kossen, N., Joha, A. 1978. Model for oxygen transfer in a shake flask. *Biotechnol Bioeng* . 20: 1695-1709.



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS e INGENIERÍA

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



"1919-2019: en memoria del General Emiliano Zapata Salazar"

FORMA T-4A
NOMBRAMIENTO COMITÉ REVISOR

Cuernavaca, Mor., a 25 de Noviembre de 2019.

ING. VICTOR MANUEL NOGUEIRA CARDIN
DRA. TANIA CASTILLO MARENCO
Q.I EDUARDO ANGEL GARCÍA RAMÍREZ
MTRA. GENOVEVA BUSTOS RIVERA BAHENA
DRA. VALERI DOMINGUEZ VILLEGAS
P R E S E N T E

Me permito comunicarles que han sido designados integrantes del COMITÉ REVISOR de la TESIS Titulada:

Caracterización de la producción de alginato en las cepas de *Azotobacter vinelandii* OP AlgU+ y GG9, bajo diferentes condiciones de transferencia de oxígeno

Que presenta el **G. DIEGO RAMOS PERALTA**, del programa educativo de: QUÍMICO INDUSTRIAL.



ATENTAMENTE
Por una humanidad culta

DRA. VIRIDIANA AYDEE LEÓN HERNÁNDEZ
DIRECTORA
D I C T A M E N

DRA. VIRIDIANA AYDEE LEÓN HERNÁNDEZ
DIRECTORA DE LA FCQeI
P R E S E N T E

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

VOTO	NOMBRE	FIRMA
Aprobatorio	ING. VICTOR MANUEL NOGUEIRA CARDIN	
Aprobatorio	DRA. TANIA CASTILLO MARENCO	
Aprobatorio	Q.I. EDUARDO ANGEL GARCÍA RAMÍREZ	
Aprobatorio	MTRA. GENOVEVA BUSTOS RIVERA BAHENA	
Aprobatorio	DRA. VALERI DOMINGUEZ VILLEGAS	

VRL17 mog