



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALPARAÍSO
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA

Proyecto de Título

**“INFLUENCIA DE LA VELOCIDAD DE AGITACIÓN SOBRE LA PRODUCCIÓN DE
ALGINATO EN CULTIVOS POR LOTES DE UNA MUTANTE DE *AZOTOBACTER
VINELANDII* NO PRODUCTORA DE PHB”**

Alumno: Alonso Godoy Castillo
Profesor Guía: Álvaro Díaz Barrera

A Mi Familia...

RESUMEN

Los alginatos son polisacáridos lineales compuestos por cantidades variables de ácido manurónico y gulurónico. En la industria alimentaria son empleados como espesantes, gelificantes y estabilizantes, y en la industria farmacéutica como agente desintegrador y de suspensión para tabletas y antibióticos. La bacteria *Azotobacter vinelandii* es una bacteria aerobia obligada con la capacidad de fijar nitrógeno y producir dos biopolímeros, el poliéster intracelular poli-hidroxibutirato (PHB) y el alginato como un exopolisacárido. Con el fin de favorecer y obtener una mayor producción de alginato se hace necesario disminuir la síntesis de PHB.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la velocidad de agitación sobre el crecimiento celular, producción de alginato y velocidad de transferencia de oxígeno, en cultivos por lotes de *Azotobacter vinelandii* AT12, la cual es una cepa modificada no productora de PHB, proporcionada por el Dr. Carlos Peña del Instituto de Biotecnología, perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Inicialmente se realizaron cultivos con la cepa modificada *A. vinelandii* AT12 y silvestre *A. vinelandii* ATCC 9046 en matraces Erlenmeyer de 250 [mL] con 50 [mL] de volumen de cultivo, con un medio mínimo definido con sacarosa o glucosa como fuentes de carbono, en condiciones de fijación de nitrógeno atmosférico a 30 °C y 200 [rpm] durante 72 horas de cultivo. Posteriormente se realizaron cultivos de *A. vinelandii* AT12 en un biorreactor de 3 [L], con 2 [L] de volumen de trabajo y con un medio mínimo definido con sacarosa como fuente de carbono, en condición de fijación de nitrógeno atmosférico, con un flujo de aireación de 1 vvm, sin control de la tensión de oxígeno disuelto (TOD) a 30 °C y velocidades de agitación de 300, 500 y 700 [rpm]. También se realizaron cultivos de *A. vinelandii* ATCC 9046 en biorreactor a la condición de cultivo con mayor productividad específica. De estos cultivos celulares se analizó la concentración de biomasa (Peso seco y Espectrofotometría), de sacarosa (hidrólisis enzimática-DNS), de glucosa (DNS), de alginato (Gravimetría), de PHB (HPLC) y peso molecular del alginato (GPC-HPLC).

Los resultados a nivel de matraces muestran que la cepa *A. vinelandii* AT12 es más productiva que la cepa *A. vinelandii* ATCC 9046 cuando se utiliza sacarosa o glucosa como fuente de carbono, pero es con sacarosa que se obtuvo la mayor productividad específica de alginato (q_{Alg}) y rendimiento de alginato por unidad de biomasa ($Y_{Alg/X}$) con valores de 0,05 [$g_{alginato}/g_{biomasa} \cdot h$] y 1,53±0,34

[g_{alginato}/g_{biomasa}] respectivamente. En tanto a nivel de biorreactor con la cepa *A. vinelandii* AT12 no se aprecia un claro efecto de la velocidad de agitación sobre el rendimiento de alginato por unidad de biomasa ($Y_{Alg/X}$), pero sí sobre la productividad específica del alginato (q_{Alg}), para los cuales los mayores valores se obtuvo a 500 [rpm] con valores de 0,054 [g_{alginato}/g_{biomasa}*h] y 1,37±0,08 [g_{alginato}/g_{biomasa}] respectivamente. Además a esta velocidad de agitación se obtuvo una velocidad de transferencia de oxígeno máxima (VTO_{máx}) de 9,8 [mmol O₂/L*h] y un peso molecular máximo de 337 [KDa], obteniendo un cociente respiratorio (RQ) entre 0,97±0,12 [mmol CO₂/mmol O₂].

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que directa o indirectamente me han ayudado durante este largo camino universitario, el cual culmina con la entrega de este proyecto de título.

En primer lugar agradezco a mi profesor guía Álvaro Díaz por su apoyo, consejos y sabiduría, lo cual me ayudaran para ser un mejor profesional.

A mis compañeras de laboratorio Luisa y Nataly por el tiempo que dedicaron en ayudarme con los análisis y dudas que salían en el camino, las conversaciones y tecitos que hicieron los días de laboratorio más agradables.

A todos mis compañeros de generación 2008, en especial a mis amigos Matías (Matita), Sebastián (Rata), Sebastián (Frodo), Benjamín (Benja) y Juan Ignacio (Nachó) con los cuales compartí horas interminables de trabajo, estudios y sobre todo esparcimiento. Gracias por haber hecho de mi etapa universitaria un camino lleno de vivencias que nunca olvidare.

Finalmente gracias a mi familia, abuelos, tíos, padres, hermana y novia por su ayuda, dedicación y amor que me han entregado en todo momento, ya que sin ese apoyo incondicional este logro familiar de ser un ingeniero no hubiese sido posible.

A todos, INFINITAS GRACIAS.

ÍNDICE GENERAL

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	INFORMACIÓN GENERAL	1
1.2.	OBJETIVOS	3
1.2.1.	Objetivo general.....	3
1.2.2.	Objetivos específicos.....	3
2.	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1.	ALGINATO.....	4
2.2.	<i>AZOTOBACTER VINELANDII</i>	8
2.2.1.	Fijación de nitrógeno.....	9
2.3.	BIOSÍNTESIS DE ALGINATO.....	10
2.3.1.	Síntesis del precursor	11
2.3.2.	Polimerización y transferencia a la membrana citoplasmática	12
2.3.3.	Transferencia periplasmática y modificación.....	12
2.3.4.	Exportación a través de la membrana externa	13
2.4.	MUTANTES DE <i>AZOTOBACTER VINELANDII</i>	14
2.4.1.	Cepa <i>A. vinelandii</i> AT12.....	15
	Construcción cepa <i>A. vinelandii</i> AT12	16
2.5.	FACTORES QUE DETERMINAN LA PRODUCCIÓN DE ALGINATO	17
2.5.1.	Efecto del medio de cultivo.....	17
2.5.2.	Efecto de la tensión de oxígeno disuelto (TOD) y velocidad de agitación (rpm)	19
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
3.1.	MICROORGANISMOS	23
3.2.	MEDIOS DE CULTIVO	23
3.3.	PREPARACIÓN DEL INÓCULO	24

3.4.	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	26
3.5.	MÉTODOS ANALÍTICOS.....	30
3.5.1.	Determinación de concentración de biomasa	30
	Método de turbidimetría	30
	Método de peso seco.....	30
3.5.2.	Determinación de concentración de sacarosa por invertasa-DNS y glucosa por DNS... 30	
3.5.3.	Extracción y cuantificación del alginato	31
3.5.4.	Cuantificación de PHB	31
3.5.5.	Determinación del peso molecular del alginato	32
3.6.	CÁLCULO DE LA VELOCIDAD DE TRANSFERENCIA DE OXÍGENO Y DIÓXIDO DE CARBONO ... 33	
3.7.	CÁLCULO DE VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO	34
3.8.	CÁLCULO DE RENDIMIENTOS.....	34
3.9.	CÁLCULO DE PRODUCTIVIDAD Y VELOCIDAD DE CONSUMO	35
3.10.	BALANCE DE CARBONO.....	36
4.	RESULTADOS	39
4.1.	CULTIVOS EN MATRACES DE LAS CEPAS A. <i>VINELANDII</i> ATCC 9046 Y AT12.....	39
4.1.1.	Efecto de la sacarosa y glucosa como fuentes de carbono sobre la producción de biomasa, alginato, PHB y consumo de fuente de carbono	39
4.2.	CULTIVOS EN BIORREACTOR DE LAS CEPAS A. <i>VINELANDII</i> AT12.....	47
4.2.1.	Efecto de la velocidad de agitación sobre la producción de biomasa, alginato, PHB y consumo de sacarosa.....	47
4.2.2.	Efecto de la velocidad de agitación sobre la tensión de oxígeno disuelto (TOD), la velocidad de transferencia de oxígeno (VTO) y dióxido de carbono (VTCO ₂).....	52
4.2.3.	Balance de carbono a diferentes velocidades de agitación	55
4.3.	COMPARACIÓN DE LAS CEPAS DE <i>AZOTOBACTER VINELANDII</i> ATCC 9046 y AT12 A 500 [RPM]	56

5. DISCUSIONES.....	61
6. CONCLUSIONES	65
7. RECOMENDACIONES	66
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
APÉNDICE	72
APÉNDICE A: PROTOCOLO MÉTODOS ANALÍTICOS.....	72
APÉNDICE A.1: Determinación del crecimiento microbiano por espectrofotometría y peso seco	72
APÉNDICE A.2: Determinación de la concentración de sacarosa por Invertasa-DNS y glucosa por DNS.....	73
APÉNDICE B: CURVAS DE CALIBRADO	76
APÉNDICE B.1: Curva de calibrado Biomasa	76
APÉNDICE B.2: Curva de calibrado Sacarosa.....	79
APÉNDICE B.3: Curva de calibrado Glucosa	80
APÉNDICE B.4: Curva de calibrado de <i>Ácido Crotónico</i>	81
APÉNDICE B.5: Curva de calibrado Peso Molecular	81
APÉNDICE C: RESULTADOS	83
APÉNDICE C.1: Método de cuantificación de biomasa	83
APÉNDICE C.2: Ajustes de los cultivos en matraces.....	84
APÉNDICE C.3: Ajustes de los cultivos en biorreactor.....	86
APÉNDICE D: PLAN DE TRABAJO	88

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1: Propiedades funcionales y usos industriales del alginato	5
Tabla 2.2: Precios promedios de hidrocoloides de algas	6
Tabla 2.3: Mercado del Alginato por segmentos	6

Tabla 2.4: Concentración máxima y rendimiento de alginato producido por diferentes cepas mutantes de <i>A. vinelandii</i> , obtenidas de la cepa ATCC 9046	15
Tabla 2.5: Comparación de Producción de poli- β -hidroxibutirato (PHB) y las actividades biosintéticas entre la cepa ATCC 9046 y la mutante AT12	16
Tabla 2.6: Parámetros cinéticos de <i>A. vinelandii</i> utilizando glucosa	18
Tabla 2.7: Parámetros cinéticos de <i>A. vinelandii</i> 9046 a baja aireación utilizando glucosa	18
Tabla 2.8: Resultados cultivos de <i>A. vinelandii</i> ATCC 9046 en matraces utilizando sacarosa	19
Tabla 2.9: Rendimientos de <i>A. vinelandii</i> ATCC 9046 en matraces utilizando sacarosa	19
Tabla 2.10: Constantes cinéticas de <i>A. vinelandii</i> ATCC 9046 en función de la TOD y velocidad de agitación	20
Tabla 2.11: $VTO_{m\acute{a}x}$ y PMP de <i>A. vinelandii</i> ATCC 9046 en función de la velocidad de agitación	21
Tabla 2.12: PMP del alginato y parámetros cinéticos de <i>A. vinelandii</i> ATCC 9046 en función de la TOD y velocidad de agitación.....	22
Tabla 3.1: Composición de medio de cultivo para <i>A. vinelandii</i> ATCC 9046 y AT12	23
Tabla 3.2: Condición de cultivo para matraces	26
Tabla 3.3: Condiciones de cultivo para Biorreactor	27
Tabla 3.4: Nomenclatura del sistema experimental implementado	28
Tabla 4.1: PHB (%p/p) y biomasa sin PHB en cepas <i>A. vinelandii</i> ATCC 9046 y AT12, utilizando sacarosa o glucosa como fuente de carbono.....	42
Tabla 4.2: Parámetros cinéticos de las cepas <i>A. vinelandii</i> ATCC 9046 y AT12, utilizando sacarosa o glucosa como fuente de carbono.....	42
Tabla 4.3: Productividades y velocidad de consumo de sustrato de las cepas <i>A. vinelandii</i> ATCC 9046 y AT12, utilizando sacarosa o glucosa como fuente de carbono.....	43
Tabla 4.4: PMP máximos de alginato para las cepas <i>A. vinelandii</i> ATCC 9046 y AT12, utilizando sacarosa o glucosa como fuente de carbono.....	45
Tabla 4.5: PHB (%p/p) y biomasa sin PHB para las cepas <i>A. vinelandii</i> AT12, a diferentes velocidades de agitación.....	49

Tabla 4.6: Parámetros cinéticos de las cepas <i>A. vinelandii</i> AT12, a diferentes velocidades de agitación.	50
Tabla 4.7: Productividades y velocidad de consumo de sacarosa de las cepas <i>A. vinelandii</i> AT12, a diferentes velocidades de agitación.....	50
Tabla 4.8: PMP máximo del alginato para la cepa <i>A. vinelandii</i> AT12, a diferentes velocidades de agitación.	52
Tabla 4.9: Velocidad de transferencia de oxígeno y dióxido de carbono máxima para la cepa de <i>A. vinelandii</i> AT12, a diferentes velocidades de agitación.	54
Tabla 4.10: Cociente respiratorio para la cepa de <i>A. vinelandii</i> AT12, a diferentes velocidades de agitación.	54
Tabla 4.11: Balance de carbono para las diferentes velocidades de agitación.....	55
Tabla 4.12: PHB (%p/p) y biomasa sin PHB para la cepa <i>A. vinelandii</i> ATCC 9046 a 500 [rpm].....	57
Tabla 4.13: Parámetros cinéticos de las cepas <i>A. vinelandii</i> ATCC 9046 a 500 [rpm].....	57
Tabla 4.14: Productividades y velocidad de consumo de sustrato de las cepas <i>A. vinelandii</i> ATCC 9046 y AT12, a 500 [rpm].	58
Tabla 4.15: Resumen comparativo entre las cepas de <i>A. vinelandii</i> ATCC 9046 y AT12 a 500 [rpm]....	60
Tabla B.1: Datos brutos para el cálculo de la concentración de biomasa ATCC 9046.	76
Tabla B.2: Datos brutos para obtención de la curva de calibrado de biomasa ATCC 9046.	76
Tabla B.3: Datos brutos para el cálculo de la concentración de biomasa AT12.	77
Tabla B.4: Datos brutos para obtención de la curva de calibrado de biomasa AT12.	78
Tabla B.5: Datos brutos para obtención de la curva de calibrado de sacarosa.	79
Tabla B.6: Datos brutos para obtención de la curva de calibrado de glucosa.	80
Tabla C.1: Ajustes crecimiento de biomasa para las cepas <i>A. vinelandii</i> ATCC 9046 y AT12, utilizando sacarosa o glucosa como fuente de carbono.....	84
Tabla C.2: Ajustes consumo de fuente de carbono para las cepas <i>A. vinelandii</i> ATCC 9046 y AT12, utilizando sacarosa o glucosa como fuente de carbono.	85

Tabla C.3: Ajustes producción de alginato para las cepas <i>A. vinelandii</i> ATCC 9046 y AT12, utilizando sacarosa o glucosa como fuente de carbono.....	85
Tabla C.4: Ajustes crecimiento de biomasa para la cepa <i>A. vinelandii</i> AT12, a diferentes velocidades de agitación.....	86
Tabla C.5: Ajustes consumo de sacarosa para la cepa <i>A. vinelandii</i> AT12, a diferentes velocidades de agitación.....	86
Tabla C.6: Ajustes producción de alginato para la cepa <i>A. vinelandii</i> AT12, a diferentes velocidades de agitación.....	87
Tabla C.7: Ajustes crecimiento de biomasa, consumo de sacarosa y producción de alginato para la cepa <i>A. vinelandii</i> ATCC 9046 a 500 [rpm].	87

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1: Estructura química del alginato	4
Figura 2.2: Porcentaje de contribución de cada segmento en el mercado del Alginato	7
Figura 2.3: Microfotografía electrónica de <i>A. vinelandii</i>	8
Figura 2.4: Biosíntesis de alginato y poli- β -hidroxibutirato (PHB) en <i>A. vinelandii</i>	10
Figura 2.5: Modelo del complejo multiproteico involucrado en la polimerización, modificación y exportación del alginato.....	11
Figura 2.6: Mapa genético de las regiones biosintéticas de PHB de <i>A. vinelandii</i> y plásmido construido	16
Figura 2.7: Microfotografía electrónica de los quistes formados por cepas de <i>A. vinelandii</i>	17
Figura 3.1: Propagaciones necesarias para la experiencia en matraces.....	25
Figura 3.2: Propagaciones necesarias para la experiencia en biorreactor.	25
Figura 3.3: Fotografía (A) y esquema (B) del sistema experimental implementado	28
Figura 3.4: Diagrama de metodología experimental.	29

Figura 4.1: Cinética de crecimiento, consumo de fuente de carbono y producción de alginato en matraces de <i>A. vinelandii</i> ATCC 9046 y AT12, utilizando sacarosa o glucosa como fuente de carbono a 30°C y 200 [rpm].	40
Figura 4.2: Comparación por fuente de carbono para las cepas <i>A. vinelandii</i> ATCC 9046 y AT12 en cuanto al crecimiento de biomasa máxima y producción de alginato máxima.	41
Figura 4.4: Peso molecular promedio del alginato en cultivos en matraces de <i>A. vinelandii</i> ATCC 9046 y AT12, utilizando sacarosa o glucosa como fuente de carbono a 30°C y 200 [rpm].	45
Figura 4.5: Valores de pH en el transcurso de los cultivos de <i>A. vinelandii</i> ATCC 9046 y AT12, utilizando sacarosa o glucosa como fuente de carbono a 30°C y 200 [rpm].	46
Figura 4.6: Cinética de crecimiento, consumo de sacarosa y producción de alginato en Biorreactor de <i>A. vinelandii</i> AT12 a 300, 500 y 700 [rpm], 30°C y 1vvm.	47
Figura 4.7: Comparación por velocidad de agitación para la cepa de <i>A. vinelandii</i> AT12 en cuanto al crecimiento de biomasa máxima y producción de alginato máxima.	48
Figura 4.8: Velocidad específica de crecimiento de la cepa <i>A. vinelandii</i> AT12, a 300, 500 y 700 [rpm], 30°C y 1vvm.	51
Figura 4.9: Peso molecular promedio del alginato en cultivos en biorreactor de <i>A. vinelandii</i> AT12, a 300, 500 y 700 [rpm], 30°C y 1vvm.	51
Figura 4.10: Perfiles de TOD en cultivos en biorreactor de <i>A. vinelandii</i> AT12, a 300, 500 y 700 [rpm], 30°C y 1vvm.	52
Figura 4.11: Velocidad de transferencia de oxígeno (A) y dióxido de carbono (B) en cultivos en biorreactor de <i>A. vinelandii</i> AT12, a 300, 500 y 700 [rpm], 30°C y 1vvm.	53
Figura 4.12: Cinética de crecimiento, consumo de sacarosa y producción de alginato en cultivos en biorreactor de <i>A. vinelandii</i> ATCC 9046 a 500 [rpm], 30°C y 1vvm.	57
Figura 4.13: Velocidad específica de crecimiento en el tiempo de fase de crecimiento de la cepa <i>A. vinelandii</i> ATCC 9046 a 500 [rpm], 30°C y 1vvm.	58
Figura 4.14: PMP del alginato durante el cultivo de <i>A. vinelandii</i> ATCC 9046 a 500 [rpm], 30°C y 1vvm.	59
Figura 4.15: Perfil de TOD en cultivos de <i>A. vinelandii</i> ATCC 9046 a 500 [rpm], 30°C y 1vvm.	59

Figura B.1: Curva de calibrado para la determinación de biomasa por espectrofotometría para <i>A. vinelandii</i> ATCC 9046 utilizando sacarosa como fuente de carbono.	77
Figura B.2: Curva de calibrado para la determinación de biomasa por espectrofotometría para <i>A. vinelandii</i> AT12 utilizando sacarosa como fuente de carbono.	78
Figura B.3: Curva de calibrado sacarosa.	79
Figura B.4: Curva de calibrado glucosa.	80
Figura C.1: Diferencia perfiles de crecimiento de biomasa en cultivos de <i>A. vinelandii</i> ATCC 9046 utilizando diferentes técnicas de medición:	83
Figura C.2: Diferencia de perfiles de crecimiento de biomasa en cultivos de <i>A. vinelandii</i> AT12 utilizando diferentes técnicas de medición:	84

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

1.1. INFORMACIÓN GENERAL

Los alginatos son polisacáridos lineales compuestos por residuos de ácido manurónico y gulurónico. En la industria son empleados como espesantes, gelificantes y estabilizantes. El alginato es extraído a partir de algas marinas, sin embargo estos pueden ser obtenidos de fuentes bacterianas como *Azotobacter* (Peña, Campos y Galindo, 1997).

Los alginatos obtenidos a partir de algas marinas presentan dificultades para su purificación, lo que resulta en productos costosos. El producto es difícil de purificar, debido a la presencia en las algas de otro tipo de polisacáridos. Además los bajos rendimientos en la extracción del ácido algínico (10 –40% peso seco de alga), las fluctuaciones estacionales en el contenido de alginato y el alto contenido de impureza contribuyen al alto costo del producto. Los problemas anteriores han provocado que esta industria busque alternativas de producción, encontrando en la obtención de alginatos por fermentación microbiana una opción técnica y económicamente atractiva (García-Garibay, Quintero-Ramírez y López-Munguía, 2004).

Un aspecto de gran importancia en la producción de polisacáridos microbianos, es la capacidad de influir sobre su composición y propiedades, mediante el control de las condiciones en el medio de cultivo, además de la posibilidad de obtener un material de composición química uniforme. La enorme diversidad de polímeros que son sintetizados por microorganismos permite plantear la posibilidad de encontrar un polisacárido con propiedades físicas de interés para diversas aplicaciones industriales (Rehm y Valla, 1997). Estas características hacen que la producción de alginatos por *A. vinelandii* sea la mejor alternativa biotecnológica para su estudio e implementación.

La síntesis de alginato por *A. vinelandii* ATCC 9046 en cultivos por lotes ha sido altamente estudiada (Peña et al., 1997; Díaz-Barrera, Peña y Galindo, 2007; Peña, Galindo y Büchs, 2011). Además la producción de alginato se ha estudiado mediante la manipulación de la velocidad de agitación (Peña, Trujillo-Roldán y Galindo, 2000; Díaz-Barrera et al., 2007; Lozano, Galindo y Peña, 2011), en los cuales

se ha evidenciado que el aumento en la velocidad de agitación tiene un efecto favorable en la producción de alginato.

También se ha considerado que modificaciones genéticas en *A. vinelandii* permitirán la síntesis de alginatos con características específicas y con propiedades mejoradas en relación a los alginatos provenientes de algas, con el fin de hacerlos eventualmente competitivos (Galindo, Peña, Núñez, Segura y Espín, 2007). Algunas mutantes como AT6, SML2, CNT26 y AT265 han sido estudiadas en cuanto a la producción de alginato (Peña et al., 2002; Trujillo-Roldán, Moreno, Segura, Galindo y Espín, 2003; Segura, Cruz y Espín, 2003).

Sin embargo no se ha llevado a cabo una investigación respecto a la cepa modificada *A. vinelandii* AT12, la cual es una cepa no productora de PHB y equivalente a la cepa *A. vinelandii* AT6. Por lo tanto sería importante determinar las características de la cepa AT12 con respecto al crecimiento celular, producción de alginato y velocidad de transferencia de oxígeno cuando se varía la velocidad de agitación.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de la velocidad de agitación sobre el crecimiento celular, producción de alginato y velocidad de transferencia de oxígeno en cultivos de *Azotobacter vinelandii* AT12.

1.2.2. Objetivos específicos

Determinar el efecto de utilizar sacarosa o glucosa como fuentes de carbono sobre la productividad específica de alginato (q_{Alg}) y rendimiento de alginato por unidad de biomasa ($Y_{Alg/X}$) en cultivos de *A. vinelandii* ATCC 9046 y AT12 a nivel de matraces.

Evaluar el efecto de la velocidad de agitación sobre la productividad específica de alginato (q_{Alg}) y rendimiento de alginato por unidad de biomasa ($Y_{Alg/X}$) en cultivos de *A. vinelandii* AT12 a nivel de biorreactor.

Establecer el efecto de la velocidad de agitación con respecto a la velocidad de transferencia de oxígeno (VTO) y peso molecular promedio del alginato (PMP) en cultivos de *A. vinelandii* AT12 a nivel de biorreactor.

CAPÍTULO 2

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. ALGINATO

Los alginatos son polisacáridos con muchos usos industriales y médicos, de los aditivos alimentarios a los agentes de encapsulación en las tecnologías emergentes de trasplante. Alginato se compone de proporciones variables de ácido β -D-manurónico (M) y α -L-gulurónico (G) unida por enlaces glicosídicos. Los bloques de alginato se componen de residuos consecutivos de G, residuos consecutivos de M y residuos alternados de G y M como se aprecia en la Figura 2.1. Los alginatos extraídos difieren en la cantidad de ácido manurónico y gulurónico, como en la longitud de cada bloque (Lee y Mooney, 2012).

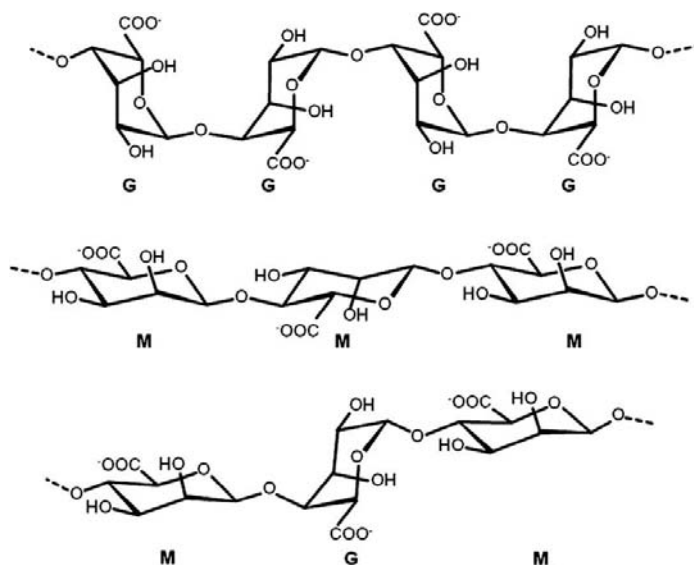


Figura 2.1: Estructura química del alginato, bloques de ácido manurónico (M), bloques de ácido gulurónico (G) y bloques alternados de G y M (Lee y Mooney, 2012).

Tradicionalmente, el alginato comercial ha sido producido por algas pardas, pero este alginato presenta heterogeneidad en la composición y en la calidad debido en parte a la variación ambiental. Dos géneros de bacterias, *Pseudomonas* y *Azotobacter*, también son capaces de producir alginato como un exopolisacárido (Iain, Rehman, Ghafoor y Rehm, 2010).

Sin embargo *A. vinelandii* parece ser más apropiado para la producción de alginato, debido a los peligros potenciales de patogenicidad asociado a algunas especies de *Pseudomonas spp* (Sabra, Zeng y Deckwer, 2001).

La producción comercial anual en 1997 era alrededor de 30.000 toneladas. Los alginatos extraídos de las algas son productos relativamente baratos entre \$ 5-20 dólares por kilo de alginato para la mayoría de las aplicaciones, pero para el campo de la industria farmacéutica, productos de más alta pureza se venden hasta en \$ 40.000 dólares por kilo de alginato (Rehm y Valla, 1997).

En la Tabla 2.1 se presenta una lista de propiedades funcionales y usos industriales del alginato (García-Garibay et al., 2004).

Tabla 2.1: Propiedades funcionales y usos industriales del alginato (García-Garibay et al., 2004).

Industria	Uso	Producto
Alimentos	Estabilizador de emulsiones	Helados
	Agentes gelificantes	Postre tipo gelatina
		Rellenos de panificación
		Sustitutos de frutas
		Cubierta de embutidos
	Espesantes	Salsas y aderezos
Productos enlatados, congelados, deshidratados		
Estabilizantes de espumas		Cerveza, vinos
Farmacéutica	Emulsificador y espesante	Jabones, lociones y shampoos
	Agente desintegrador	Tabletas
	Gel absorbente	Vendajes quirúrgicos
	Agente de suspensión	Ungüentos, antibióticos
Agricultura	Agente de retención de agua	Acondicionador de suelos
Papel	Agente de suspensión	Corte y dimensionamiento de papel
Textil	Espesante, gelificante	Impresión de géneros

Las principales aplicaciones industriales de los alginatos son como espesantes, estabilizantes, agentes gelificantes y emulsionantes en las industrias alimentaria, textil y farmacéutica. Los alginatos también se han empleado ampliamente para la inmovilización de las células vivas y enzimas (Sutherland, 1990).

Los alginatos que se comercializan son principalmente sales de metales alcalinos o alcalinotérreos de ácido algínico, siendo la sal de sodio el más ampliamente utilizado en alimentos. El otro derivado de ácido algínico que se utiliza en la industria alimentaria es alginato de propilenglicol (PGA) (Bixler y Porse, 2010).

El crecimiento del mercado de alginato es una mezcla de redistribución geográfica de los mercados establecidos y algunos nuevos desarrollos en el área alimentaria y farmacéutica. En la Tabla 2.2 se presenta una estimación de los precios promedio de hidrocoloides de algas, en la Tabla 2.3 se presenta la cantidad de alginato destinado en volumen (L) para los diferentes segmentos de mercado y finalmente en la Figura 2.2 se muestra el porcentaje de contribución de cada uno de los segmentos en el mercado del alginato con respecto al total, entre los años 1999 y 2009.

Tabla 2.2: Precios promedios de hidrocoloides de algas (Bixler y Porse, 2010).

Hidrocoloides de Algas	1999 [US\$/Kg]	2009 [US\$/Kg]
Agar	17	18
Alginato	9	12
Carragenina	7	10,5

Tabla 2.3: Mercado del Alginato por segmentos (Bixler y Porse, 2010).

Segmentos de Mercado	1999 Volumen [L]	2009 Volumen [L]
Grado técnico	11000	11000
Alimentaria/Farmacéutica	8000	13000
Alimento animal	4000	1000
PGA	2000	1500
Total	25000	26500

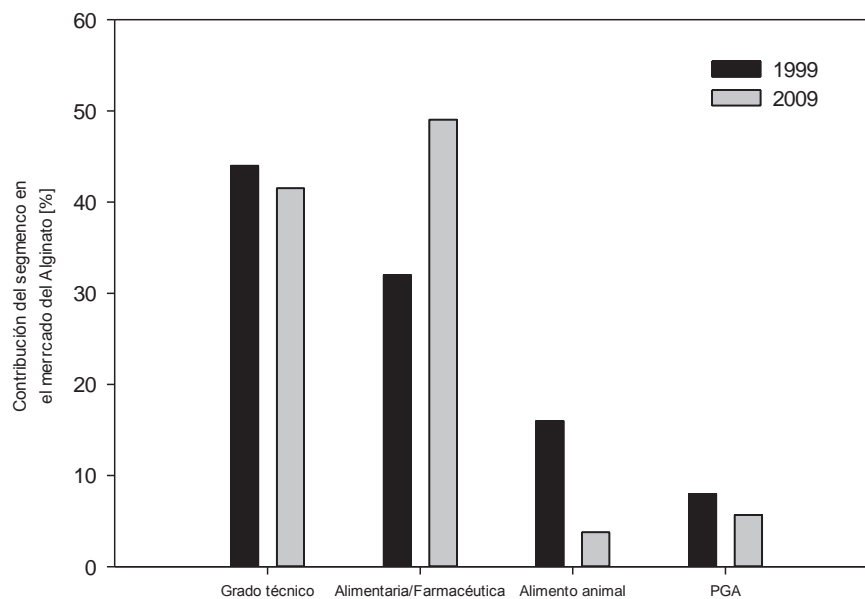


Figura 2.2: Porcentaje de contribución de cada segmento en el mercado del Alginato (Bixler y Porse, 2010).

Las bacterias tienen un gran potencial para producir alginatos de alta calidad con propiedades de materiales definidos para su uso en aplicaciones de alto valor, tales como aquellos en el campo de la medicina. Esto puede proporcionar un nicho importante para la producción comercial de alginatos bacterianos (Hay, I.D., Z. Rehman, A. Ghafoor y B. Rehm, 2010).

Tanto la acetilación como el peso molecular afectan directamente la viscosidad y otras propiedades reológicas de las soluciones de alginato (Galindo et al., 2007), por lo tanto, poder determinar el peso molecular del alginato sería de vital importancia para determinar su utilidad en determinadas aplicaciones, ya sea en el campo de los alimentos o farmacéutica.

En general, el uso de un enfoque multidisciplinario, integrando los aspectos moleculares y la bioingeniería es una necesidad para optimizar la producción de alginato en *A. vinelandii* (Galindo et al., 2007).

2.2. AZOTOBACTER VINELANDII

La familia *Azotobacteriaceae* comprende a las bacterias del género *Azotobacter*, las cuales son Eubacterias Gram-negativas que tienen una pared celular compleja, que consiste de una membrana externa y una capa interna de peptidoglicano que contiene ácido murámico y mureína. Se reproducen por fisión binaria, viven en suelos y en aguas frescas, son células ovoides y grandes de 1,5 a 2,0 [μm] de diámetro. Se les observa como células individuales o formando agregados irregulares. Fijan nitrógeno, son aerobias estrictas y presentan una alta tasa de respiración, que llega a ser diez veces superior a la de *Escherichia coli*, además pueden crecer en condiciones de bajas concentraciones de oxígeno. Son quimioorganotróficas, utilizan azúcares, alcoholes y sales inorgánicas para crecer (Espín, 2002).

Dentro del género *Azotobacter*, encontramos a la especie *vinelandii*, la cual es una bacteria aerobia obligada con la capacidad de fijar nitrógeno y de adaptar su metabolismo a diversas condiciones ambientales. *A. vinelandii* forma metabólicamente quistes, presentes después del crecimiento exponencial o tras la inducción con reactivos específicos (Sadoff, 1975).

La aplicación biotecnológica más importante de células de *A. vinelandii* es su capacidad de biosintetizar al menos tres moléculas que tienen importantes aplicaciones biotecnológicas y biomédicas. Bajo determinadas condiciones nutricionales y ambientales, esta bacteria produce el poliéster intracelular poli- β -hidroxibutirato (PHB), el polisacárido extracelular alginato y compuestos sideróforos (Díaz-Barrera y Soto, 2010) (Figura 2.4).

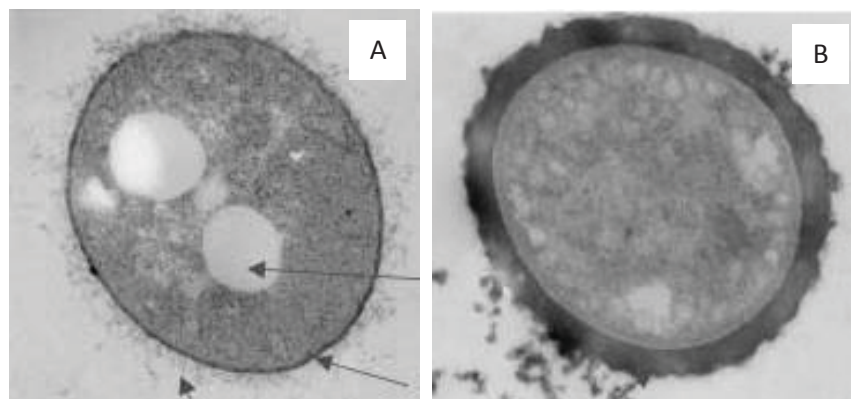


Figura 2.3: Microfotografía electronica de *A. vinelandii* con PHB intracelular acumulado (A) y rodeada de alginato (B) (Sabra et al., 2001).

2.2.1. Fijación de nitrógeno

La fijación biológica de nitrógeno es una importante vía de acceso de N a los seres vivos, el proceso requiere de un aporte considerable de ATP para su actividad como para su síntesis; que exige un consumo significativo de oxígeno durante la respiración celular (Urzúa y Baca, 2001). El complejo enzimático Nitrogenasa es responsable de este proceso, catalizando la reducción del nitrógeno a amoníaco, el cual es altamente sensible a oxígeno (Sabra et al., 2001). Para ello se han propuesto tres sistemas de protección para el sistema nitrogenasa: conformacional, protección respiratoria y autoprotección.

La protección conformacional ocurre cuando aumenta la concentración de oxígeno y esto provoca un mecanismo de inactivación de la nitrogenasa, que consiste en la formación de un complejo de nitrogenasa inactivado pero protegido. Este complejo es formado por la unión no covalente de una proteína que contiene Fe-S (FeII o Shtna) a las proteínas Fe y MoFe (Moshiri, Crouse, Johnson y Maier, 1995; Urzúa y Baca, 2001)

La protección respiratoria ocurre cuando las células se adaptan al ambiente de mayor concentración de oxígeno, donde se expresa la citocromo oxidasa cytb_d, la cual actúa junto con una NADH deshidrogenasa desacoplada. El flujo de electrones a través de esta cadena desacoplada permite tasas de respiración altas y un rápido consumo del oxígeno intracelular sin agotar ATP y NADH. Además de reducir el oxígeno la citocromo oxidasa cytb_d, funcionaría como un productor de ATP rápido, ya que se necesitan grandes cantidades de ATP para la autoprotección de la nitrogenasa (Espín, 2002).

Finalmente el mecanismo de autoprotección ocurre cuando la concentración de nitrogenasa es lo suficientemente alta en relación a la concentración de oxígeno celular. La nitrogenasa reductasa puede reducir oxígeno a H₂O. Además, el flujo constante de equivalentes reductores a través de la nitrogenasa ayuda a mantenerlo en un estado reducido (Thorneley y Ashby, 1989).

Es todavía motivo de controversia si la alta tasa respiratoria reduce la concentración intracelular de oxígeno (protección respiratoria) o solo funciona para proveer equivalentes reductores y ATP a la nitrogenasa consumidora de oxígeno (autoprotección). Sin embargo se ha comprobado que las altas tasas respiratorias son esenciales para la fijación de nitrógeno tolerante a oxígeno en *A. vinelandii* (Espín, 2002).

Se postula que la velocidad de transferencia de oxígeno en la célula se reduce por el aumento de la concentración de alginato durante el curso del cultivo de *A. vinelandii*. Este fenómeno ofrecería una concentración de oxígeno intracelular baja necesaria para la actividad de la nitrogenasa (Nosrati, R., P. Owlia, H. Sadari, M. Olamaee, I. Rasooli y T.A. Akhavian, 2012).

2.3. BIOSÍNTESIS DE ALGINATO

A. vinelandii puede metabolizar diferentes fuentes de carbono, tales como sacarosa, glucosa, fructosa, manosa, sorbitol, glicerol, gluconato, acetato (Horan, Jarman y Dawes, 1981).

La ruta de biosíntesis de alginato se puede dividir en cuatro etapas diferentes: (1) síntesis del precursor (ácido GDP-manurónico), (2) polimerización y transferencia de la membrana citoplasmática, (3) transferencia periplásmica y modificación y (4) exportación a través de la membrana externa (Remminghorst y Rehm, 2006b). A continuación en las Figuras 2.4 y 2.5 se presenta un análisis más detallado de las vías de biosíntesis de alginato y su regulación.

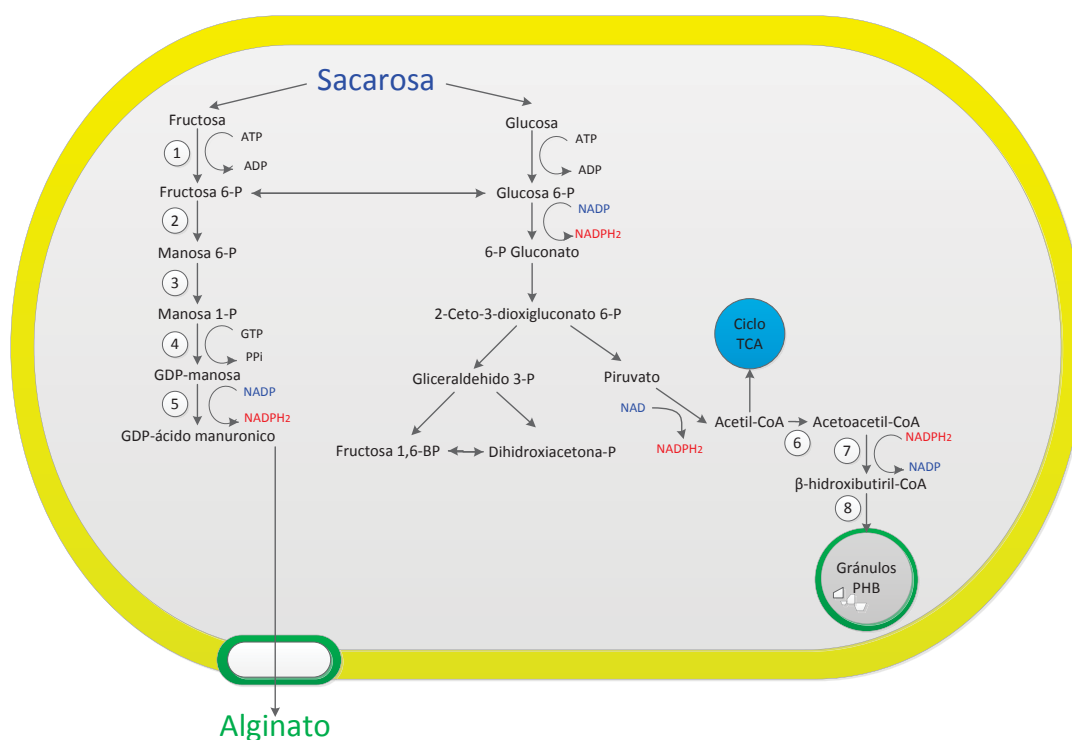


Figura 2.4: Biosíntesis de alginato y poli-β-hidroxibutirato (PHB) en *A. vinelandii*. Donde (1) Fructokinase; (2) fosfomanosa isomerasa (AlgA); (3) fosfomanomutasa AalgC; (4) GDP-manosa pirofosforilasa (AlgA); (5) GDP-manosa deshidrogenasa (AlgD); (6) β-cetotilasa (phbA); (7) acetoacetil-CoA reductasa (phbB); (8) PHB sintasa (phbC) (Díaz-Barrera y Soto, 2010).

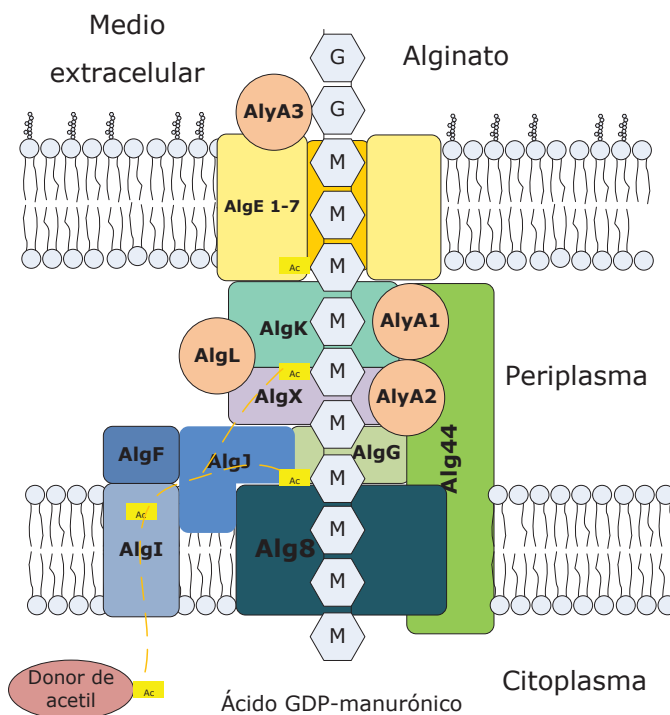


Figura 2.5: Modelo del complejo multiproteico involucrado en la polimerización, modificación y exportación del alginato (Hay, I.D., Z. Rehman, M. F. Moradali, Y. Wang y B. Rehm, 2013).

2.3.1. Síntesis del precursor

La biosíntesis de ácido GDP-manurónico se produce dentro de la célula bacteriana en el citosol. El análisis bioquímico reveló que tres enzimas están implicadas directamente en la biosíntesis de ácido GDP-manurónico (Remminghorst y Rehm, 2006b).

La síntesis comienza con la entrada de sustratos de seis carbonos a la vía de Entner-Doudoroff, catalizando hasta piruvato, que se canaliza hacia el ácido tricarbóxico (TCA), mientras que el oxalacetato en el ciclo de TCA se puede convertir en fructosa-6-fosfato a través de gluconeogenesis (Hay et al., 2010).

La conversión de la fructosa-6-fosfato a manosa-6-fosfato es catalizada por la enzima fosfomanosa isomerasa (AlgA). Luego la enzima fosfomanomutasa (AlgC) convierte directamente la manosa-6-fosfato a manosa-1-fosfato. Posteriormente la enzima GDP-manosa pirofosforilasa (AlgA) cataliza la conversión de la forma activada de manosa-1-fosfato a GDP-manosa, la cual por la acción de la enzima GDP-manosa-deshidrogenasa (AlgD) pasa a ácido GDP-manurónico. Esta reacción catalizada

AlgD es esencialmente irreversible y proporciona el precursor directo para la polimerización, el ácido GDP-manurónico (Figura 2.4) (Hay et al., 2010).

2.3.2. Polimerización y transferencia a la membrana citoplasmática

El segundo paso en la biosíntesis de alginato implica la transferencia del precursor citoplasmático (ácido GDP-manurónico) a través de la membrana citoplasmática y la polimerización de los monómeros a polimanuronato. La polimerización alginato y exportar a través de la membrana externa podría ser coordinada a través de la formación de un complejo multiproteico que implica proteínas de la membrana citoplasmática y exterior, así como proteínas periplásmicas (Remminghorst y Rehm, 2006b).

Se cree que la AlgK, AlgG, AlgX y proteínas AlgL forman un andamio que guía el polímero a través del periplasma, para a continuación ser secretado a través de la membrana externa (Galindo et al., 2007)

Los dos genes *alg8* y *alg44* parecen estar involucrados en la transferencia de ácido GDP-manurónico a través de la membrana citoplasmática. Se ha sugerido que *alg8* y *alg44* desempeñan un papel importante en el proceso de polimerización (Remminghorst y Rehm, 2006a).

La polimerización del ácido GDP-manurónico se produce a nivel de la membrana citoplasmática por la acción de la enzima manuronato polimerasa (Alg8) obteniéndose una molécula de polimanurónico, la cual es transportada a través de la membrana citoplasmática por la enzima Alg44 (Remminghorst y Rehm, 2006b).

Sin embargo, se observó una producción de alginato al menos 10 veces mayor de *P. aeruginosa*, cuando se introdujeron las copias adicionales de Alg8. Por lo tanto, Alg8 podría ser un paso limitante de la velocidad de producción de alginato (Remminghorst y Rehm, 2006b).

2.3.3. Transferencia periplasmática y modificación

La modificación de alginato en las bacterias se produce casi exclusivamente en el periplasma, lo que sugiere que el alginato se sintetiza como polimanuronato y que la modificación se produce a nivel de polímero (Hay et al., 2010).

Enzimas modificadoras de alginato son las proteínas mejor analizadas en el proceso de biosíntesis, y la comprensión del patrón de reacción de estas enzimas pueden permitir la producción de alginatos hechos a la medida. Los genes implicados en la modificación de la cadena de alginato naciente se encuentran dentro del operón de biosíntesis bacteriana, que comprende los genes que codifican la acetilación, los cuales son el complejo enzimático (*algI*, *algJ*, *algF*), la manuronato C5-epimerasa (AlgG) y el alginato liasa (AlgL) (Figura 2.5). Las liasas de alginato, también conocidas como alginasas o despolimerasas alginato, catalizan la reacción de β -eliminación que conduce a la degradación de alginato (Remminghorst y Rehm, 2006b).

La trans-acetilación se produce en los grupos hidroxilos en la posición C2 y/o C3 de los residuos de ácido manurónico. La acetilación de estos residuos impide la epimerización de ácido gulurónico por AlgG y también evita la degradación de la cadena de alginato por AlgL (Franklin y Ohman, 1993). Por lo tanto, la acetilación de alginato controla indirectamente la epimerización y la longitud del polímero de alginato (Remminghorst y Rehm, 2006b; Hay et al., 2010). Además se ha demostrado que AlgL es prescindible para la biosíntesis de alginato y crecimiento en *Azotobacter vinelandii* (Trujillo-Roldán et al., 2003).

La posibilidad de manipular el grado de acetilación de polímero, el patrón de epimerización y el peso molecular del alginato producido por *A. vinelandii*, permitirá la producción de alginatos con diferentes propiedades.

2.3.4. Exportación a través de la membrana externa

Los análisis bioquímicos y electrofisiológicos de algE sugieren que esta proteína cumple la función de exportar el alginato. La proteína AlgJ en *A. vinelandii* comparte una alta similitud con AlgE (Rehm, Ertesvag y Valla, 1996).

El proceso de despolimerización de alginato en *A. vinelandii* parece ser muy complejo. Esta bacteria posee dos alginasas extracelulares (AlgE 1-7 y AlyA3) y tres alginasas intracelulares (AlgL, AlyA1 y AlyA2) (Gimmestad et. al., 2009).

La actividad de AlyA3 y AlgE 1-7 se ve favorecida por el calcio presente en el medio de cultivo. Por el contrario, las actividades de AlyA1 y AlyA2 no están influenciadas por el calcio (Gimmestad et. al., 2009).

2.4. MUTANTES DE *AZOTOBACTER VINELANDII*

La síntesis de alginato y PHB están bajo un control genético muy complejo, es por esto que nace la necesidad de modificación genéticamente la cepa salvaje de *A. vinelandii* ATCC 9046, con lo cual se ha producido una serie de mutantes muy interesantes para la producción de alginato.

Un estudio evaluó la producción de alginato por mutantes de *Azotobacter vinelandii*, los cuales están alterados tanto en la biosíntesis de poli- β -hidroxibutirato (PHB) como de alginato (Peña et al., 2002). Las cepas de *A. vinelandii* utilizadas en este estudio son derivadas de la cepa tipo salvaje ATCC 9046, entre las cuales se encuentran las cepas mutantes AT268, CNT26 y DM. La cepa AT268, mostró una disminución en la producción de PHB debido a una mutación en *phbR*, el cual es un gen que codifica para el activador de la transcripción del operón biosintético de *phbBAC*. La cepa CNT26 contiene una mutación (*muc26*), la cual aumenta la transcripción del gen *algD*, una de las enzimas claves en la síntesis de alginato. Finalmente la cepa DM es una mutante que lleva las dos mutaciones mencionadas anteriormente. Todas las mutantes evaluadas produjeron un 25% menos de alginato con respecto a la producida por la cepa salvaje ATCC 9046. Inesperadamente y sin relación aparente con las modificaciones genéticas realizadas, la cepa DM exhibió el peso molecular más alto jamás reportado para un alginato bacteriano (hasta $4 \cdot 10^6$ Da) (Peña et al., 2002).

Otro estudio evaluó la producción de alginato por un mutante de *Azotobacter vinelandii* incapaces de producir alginato liasa. En este estudio se construyó la cepa SML2, una cepa derivada de la cepa salvaje ATCC 9046, la cual lleva una mutante no polar dentro de *algL* (gen que codifica la actividad de la alginato liasa) (Trujillo-Roldán et al., 2003).

Estudios realizados a través de los años con diferentes cepas mutantes de *A. vinelandii* fueron registrados en el estudio (Díaz-Barrera y Soto, 2010), presentándose en Tabla 2.4 los siguientes resultados de rendimiento de alginato.

Tabla 2.4: Concentración máxima y rendimiento de alginato producido por diferentes cepas mutantes de *A. vinelandii*, obtenidas de la cepa ATCC 9046 (Díaz-Barrera y Soto, 2010).

Cepa	$Y_{Alg/S}$ normalizado	$Y_{Alg/X}$ normalizado	Alginato máximo normalizado	Condición de cultivo	Referencia
AT6	3,75	2,73	0,46	Dos etapas de fermentación	Mejía et al., 2010
	2,18	1,19	1,98		
AT6	1,15	2,68	1,16	Matraces	Segura et al., 2003
	1,37	4,18	1,42		
SML2	0,94	0,94	0,94	Biorreactor	Trujillo-Roldán et al., 2004
SML2	nd	0,49	0,65	Biorreactor	Trujillo-Roldán et al., 2003
CNT26	nd	Nd	0,74	Biorreactor	Peña et al., 2002
AT265	nd	Nd	0,74	Biorreactor	Peña et al., 2002
DM	nd	Nd	0,74	Biorreactor	Peña et al., 2002

nd: no determinado

Los rendimientos de alginato normalizados ($Y_{Alg/S}$ e $Y_{Alg/X}$) y el alginato máximo corresponde al valor obtenido utilizando cepa mutante dividido por el valor obtenido utilizando la cepa salvaje (ATCC 9046), en las mismas condiciones de cultivo. Con los resultados expuestos en la Tabla 2.4 se puede concluir que la cepa AT6 tiene un potencial alto en la producción de alginato en comparación con las otras mutantes.

2.4.1. Cepa *A. vinelandii* AT12

A. vinelandii posee los genes estructurales *phbA*, *phbB* y *phbC* para la producción de PHB a partir de Acetil-CoA. Además en la misma región de DNA donde los genes *phbBAC* están ubicados, se encontraron otros genes que también tienen relación con la producción de PHB, el gen *phbR* que codifica para un miembro de la familia AraC de activadores transcripcionales, el gen *phbP* que codifica para una proteína asociada a los gránulos de PHB y el gen *phbF* que es un regulador del gen *phbP* (Galindo et al., 2007), la cual se muestra en la Figura 2.6.

Sin embargo es de gran importancia señalar que la Cepa *A. vinelandii* AT12 es una cepa prima-hermana de la cepa *A. vinelandii* AT6.

Construcción cepa *A. vinelandii* AT12

Se construyó el plásmido pTC2 (Figura 2.6) con un fragmento de ADN proveniente de la capa AJ2, el cual es un derivado de la cepa UW136 que lleva una mutación *phbB*::mini-Tn5, transformante resistente a la kanamicina (Tn5) (Segura et al., 2003).

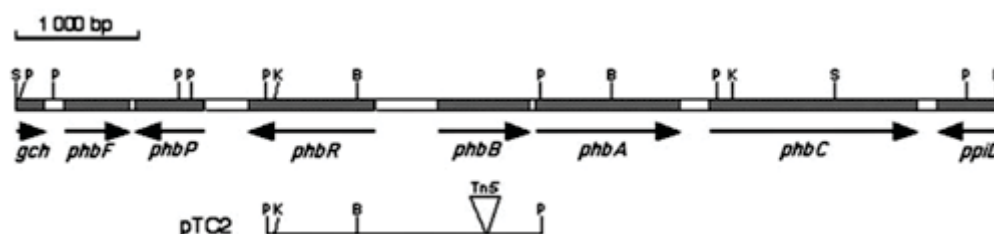


Figura 2.6: Mapa genético de las regiones biosintéticas de PHB de *A. vinelandii* y plásmido construido. Las flechas indican los ORFs. Los sitios para la mutagénesis de inserción se indican con triángulos (Segura et al., 2003)

Este plásmido que es incapaz de replicarse en *A. vinelandii*, fue introducido en la cepa salvaje ATCC 9046, para luego poder seleccionar y aislar a las cepas resistentes a la kanamicina (AT12).

Con el propósito de corroborar que la cepa AT12 no sea productora de PHB, se realizó una comparación con la cepa salvaje ATCC 9046 respecto a la producción de PHB y las actividades biosintéticas de β -cetotilasa (*phbA*), acetoacetyl-CoA reductasa (*phbB*) y PHB sintasa (*phbC*) (Segura et al., 2003). Para dicha comparación se hizo crecer las cepas en medio sólido Burk con sacarosa a 30°C por 96 hrs. Como resultado se pudo observar una reducción del 93 % en la actividad de la acetoacetyl-CoA reductasa, además de la reducción de las actividades de la β -cetotilasa y PHB sintasa, como se demuestra en la Tabla 2.5.

Tabla 2.5: Comparación de Producción de poli- β -hidroxibutirato (PHB) y las actividades biosintéticas entre la cepa ATCC 9046 y la mutante AT12 (Segura et al., 2003).

Cepa	Genotipo	PHB [μ g PHB/ mg proteína]	β -cetotilasa [nmol/min*mg proteína]	Acetoacetyl-CoA reductasa [nmol/min*mg proteína]	PHB sintasa [nmol/min*mg proteína]
ATCC 9046	tipo Salvaje	50,6 \pm 4,5	254,3 \pm 10,6	5,3 \pm 0,7	1879,8 \pm 53,0
AT12	<i>phbB</i> ::mini-Tn5	\leq 1,0	51,6 \pm 0,8	\leq 1,0	215,8 \pm 10,0

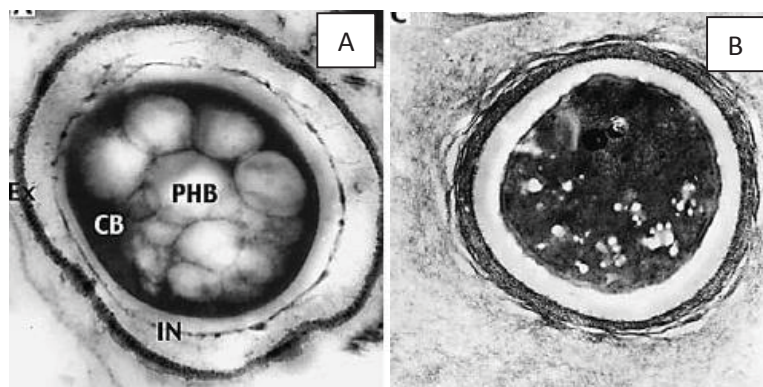


Figura 2.7: Microfotografía electrónica de los quistes formados por cepas de *A. vinelandii*. Cepa ATCC 9046 (A) y cepa AT6 (B). Exina (Ex), intina (IN), cuerpo central (CB) y polihidroxi-butirato (PHB) (Segura et al., 2003).

En la cepa AT6, la capa de exina aparece más gruesa que en la cepa ATCC 9046, dicha situación se produce por el aumento de alquilresorcinoles y la producción de alginato. Como era de suponer no se observan granulos de PHB en el cuerpo central de los quistes (Segura et al., 2003) (Figura 2.7).

2.5. FACTORES QUE DETERMINAN LA PRODUCCIÓN DE ALGINATO

2.5.1. Efecto del medio de cultivo

Hace varios años se han realizado diversos estudios respecto a la utilización diferentes fuentes de carbono que *A. vinelandii* puede metabolizar, tales como sacarosa y glucosa en la producción de alginato.

El alginato es sintetizado principalmente de la degradación de glucosa, mientras que la mayoría del polímero producido a partir de fructosa es ensamblado desde unidades de hexosa intactas. Teóricamente, el 50% de la glucosa y 100% de la fructosa se puede dirigir a la formación de alginato (Anderson, Hacking y Dawes, 1987).

Se han desarrollado estudios para optimizar la producción de alginato bacteriano a nivel de matraces variando la concentración de glucosa en el medio entre 10 a 100 [g/L], determinando que al utilizar concentraciones mayores a 20 [g/L] el crecimiento celular y la producción de alginato se ven inhibidas (Clementi, Fantozzi, Mancini y Moresi, 1995). Cuando se utilizó una condición estándar con 20 [g/L] de glucosa se alcanzaron valores estacionarios de biomasa y alginato después de las 24 y 36 horas respectivamente. Se indica que la velocidad de reducción del pH puede estar asociada con la

excreción de alginato y la velocidad de crecimiento de *A. vinelandii* (Clementi et al., 1995). Para mantener el pH constante en un valor de 7 a lo largo del cultivo se utilizó una solución MOPS en donde la producción de alginato aumento 2,5 veces, lo que demuestra la importancia del control de pH en el proceso de fermentación.

Un estudio realizado sobre la producción y caracterización de alginato en *A. vinelandii* utilizando glucosa como fuente de carbono en matraces en concentración del 20 [g/L], 6 [g/L] y solución MOPS 11,56 [g/L]. La cinética de producción de alginato fue clasificada de dos maneras, asociada (A) y no asociada (B) a crecimiento (Clementi, Crudele, Parente, Mancini y Moresi, 1999). Los resultados se muestran en la Tabla 2.6.

Tabla 2.6: Parámetros cinéticos de *A. vinelandii* utilizando glucosa. (Clementi et al., 1999).

Fermentación	μ [h ⁻¹]	$Y_{X/S}$	$Y_{Alg/S}$	$Y_{Alg/X}$	q_{Alg}
		[gbiomasa/gglucosa]	[galginato/gglucosa]	[galginato/gbiomasa]	[galginato/gbiomasa*h]
A	0,149 ± 0,008	0,30	0,14	0,47 ± 0,12	0,032 ± 0,004
B	0,148 ± 0,021	0,41	0,09	0,23 ± 0,13	0,033 ± 0,005

Un estudio más reciente realizado con *A. vinelandii* ATCC 9046, utilizando glucosa como fuente de carbono (20 [g/L]) y solución MOPS (1,42 [g/L]), en condición de alta y baja aireación demostraron que los cambios en la disponibilidad de oxígeno tuvieron un impacto considerable en los flujos metabólicos y se reflejan en la velocidad de crecimiento, la velocidad específica de consumo de glucosa, y en los rendimientos de alginato y PHB (Castillo, Heinzle, Peifer, Schneider y Peña, 2013). La condición de alta y baja aireación se diferencia en el volumen de llenado de medio de cultivo y el tipo de matraz Erlenmeyer. Para la condición de baja aireación los cultivos fueron realizados en matraces Erlenmeyer de 500 [mL] con un volumen de llenado de 100 [mL] y los resultados obtenidos se presentan en las Tabla 2.7.

Tabla 2.7: Parámetros cinéticos de *A. vinelandii* 9046 a baja aireación utilizando glucosa. Valores en paréntesis calculados con biomasa sin PHB (Castillo et al., 2013).

μ [h ⁻¹]	$Y_{X/S}$	$Y_{Alg/S}$	$Y_{Alg/X}$	q_{Alg}	q_S
	[gbiomasa/gglucosa]	[galginato/gglucosa]	[galginato/gbiomasa]	[galginato/gbiomasa*h]	[gglucosa/gbiomasa*h]
0,08 ± 0,00	0,37 ± 0,00 (0,11 ± 0,00)	0,12 ± 0,02	0,32 ± 0,05 (1,09 ± 0,18)	0,053 ± 0,012 (0,055 ± 0,011)	0,124 ± 0,013 (0,150 ± 0,020)

Estudios más recientes realizados con *A. vinelandii* ATCC 9046 se evaluó el efecto de la transferencia de oxígeno sobre el poder viscosificante, el grado de acetilación y peso molecular del alginato. Para la condición control se utilizó como medio de cultivo el medio Burk, el cual contenía sacarosa (20 [g/L]), extracto de levadura (3 [g/L]) y solución MOPS (1,42 [g/L]), a 200 [rpm] y 29 °C (Peña et al., 2011). Los resultados del cultivo control se muestran en la Tablas 2.8 y 2.9.

Tabla 2.8: Resultados cultivos de *A. vinelandii* ATCC 9046 en matraces utilizando sacarosa (Peña et al., 2011)

RQ	Alginato máx [g/L]	Biomasa máx [g/L]	PHB [%p/p]	μ [h ⁻¹]	Sacarosa Final [g/L]
0,95	4,3 ± 0,11	3,7 ± 0,2	80 ± 4	0,110 ± 0,001	6,4 ± 1,0

Tabla 2.9: Rendimientos de *A. vinelandii* ATCC 9046 en matraces utilizando sacarosa, calculados en base a datos obtenidos por Peña et al., 2011.

$Y_{X/S}$ [g _{biomasa} /g _{sacarosa}]	$Y_{Alg/S}$ [g _{alginato} /g _{sacarosa}]	$Y_{Alg/X}$ [g _{alginato} /g _{biomasa}]
0,27 ± 0,03	0,32 ± 0,3	1,16 ± 0,03

2.5.2. Efecto de la tensión de oxígeno disuelto (TOD) y velocidad de agitación (rpm)

Varios estudios en cultivos por lotes han puesto en manifiesto la importancia de la tensión de oxígeno disuelto (TOD) y la velocidad de agitación sobre la producción de alginato y su peso molecular en cultivo de *A. vinelandii*.

Cultivos realizados con la cepa salvaje de *A. vinelandii* ATCC 9046 llevados a cabo en biorreactores a 300 rpm y bajo condiciones de TOD constante de un 5% durante 72 horas, las bacterias producen una mayor concentración de alginato (4,5 [g/L]), en cambio trabajando con una TOD constante de 0,5% se obtuvo una baja concentración de alginato (1,0 [g/L]). Por otra parte, se realizó un cultivo en biorreactor modalidad lote a TOD constante de 3% y dos distintas velocidades de agitación, las cuales fueron 300 y 700 [rpm]. En el cultivo a 300 [rpm] se obtuvo una velocidad específica de crecimiento de 0,14 h⁻¹ con una productividad específica de alginato de 0,026 (g/g*h), mientras que a 700 [rpm] se obtuvo una velocidad específica de crecimiento de 0,23 h⁻¹ con una productividad específica de alginato de 0,07 (g/g*h). Sin embargo, en cultivos a una velocidad de agitación de 300 [rpm], se

obtuvo un polímero con un peso molecular de 680 kDa y en cultivos a 700 [rpm] se obtuvo polímeros de peso molecular de 352 kDa (Peña et al., 2000).

En Tabla 2.10 se muestra con más detalle lo mencionado anteriormente, en cuanto a la influencia de la TOD y velocidad de agitación en los parámetros cinéticos.

Tabla 2.10: Constantes cinéticas de *A. vinelandii* ATCC 9046 en función de la TOD y velocidad de agitación (Peña et al., 2000)

TOD [%]	Velocidad de agitación [rpm]	μ [h^{-1}]	q_{Alg} [g _{alginato} /g _{biomasa} *h]	q_S [g _{sustrato} /g _{biomasa} *h]	Condición de cultivo	Referencia
0,5	300	0,07	0,015	0,060	Biorreactor	Peña et al., 2000
1,0	300	0,11	0,023	0,080	Biorreactor	Peña et al., 2000
3,0	300	0,14	0,026	0,120	Biorreactor	Peña et al., 2000
5,0	300	0,20	0,028	0,110	Biorreactor	Peña et al., 2000
3,0	500	0,20	0,048	0,200	Biorreactor	Peña et al., 2000
3,0	700	0,23	0,070	0,250	Biorreactor	Peña et al., 2000
-	200	0,09	0,020	0,070	Matraz agitado	Peña et al., 1997

En otro ensayo se estudió la influencia de la velocidad de transferencia de oxígeno (VTO) en el peso molecular del alginato. En cultivos discontinuos sin control de la tensión de oxígeno disuelto (TOD) y a diferentes velocidades de agitación (260, 340, 400, y 560 [rpm]), la TOD era cero y la VTO se mantuvo constante durante el crecimiento de la biomasa, por lo tanto, los cultivos limitaban por oxígeno (Díaz-Barrera et al., 2007).

En general, los resultados mostraron que la VTO influye en el peso molecular de alginato. Se observó además que el peso molecular del alginato aumentó a medida que disminuyó la velocidad de transferencia de oxígeno máxima ($VTO_{\text{máx}}$), la cual corresponde al máximo valor de VTO constante en la fase de crecimiento a una TOD de cero o bajo limitación de oxígeno.

En cultivos desarrollados a una $VTO_{\text{máx}}$ de 9,0 (mmol/L*h) (a 560 [rpm]), el peso molecular promedio del alginato (PMP) era cerca de 220 kDa (a las 21 horas de cultivo) y en cultivos desarrollados en una $VTO_{\text{máx}}$ de 3,0 (mmol/L*h), el PMP del alginato fue siete veces mayor en comparación con el obtenido en $VTO_{\text{máx}}$ de 9,0 (mmol/L*h), 1.560 kDa (a las 33 horas de cultivo). Un aumento del peso molecular

puede ser una respuesta bacteriana a las condiciones nutricionales adversas, tales como la limitación de oxígeno (Díaz-Barrera et al., 2007).

La velocidad de agitación no sólo afectó el nivel $VTO_{m\acute{a}x}$, sino que también afectó su duración durante el cultivo. La duración de $VTO_{m\acute{a}x}$ a 260 y 340 [rpm] fueron 58 y 30 horas de cultivo. En cultivos a 400 y 560 [rpm], fueron de 28 y 6 horas (Díaz-Barrera et al., 2007).

En Tabla 2.11 se muestra con más detalle cómo afecta la velocidad de agitación a la $VTO_{m\acute{a}x}$ y al PMP.

Tabla 2.11: $VTO_{m\acute{a}x}$ y PMP de *A. vinelandii* ATCC 9046 en función de la velocidad de agitación (Díaz-Barrera et al., 2007)

Velocidad de agitación [rpm]	VTO [mmol O_2 /L*h]	PMP [kDa]
560	9	220
260	3	1560

Otro estudio donde se evaluó la velocidad de transferencia de oxígeno máxima ($VTO_{m\acute{a}x}$) y la velocidad de agitación sobre la producción de alginato y la evolución del peso molecular del polímero producido por una cepa salvaje de *A. vinelandii* ATCC 9046 bajo condiciones de limitación y no limitación de oxígeno (Lozano et al., 2011).

En las dos condiciones de oxígeno disuelto evaluados (0,5 Y 5% de TOD), se pudo apreciar que al aumentar la velocidad de agitación de 300 a 700 [rpm] causó un aumento significativo en la $VTO_{m\acute{a}x}$. En el cultivo llevado a cabo a 5% de TOD la $VTO_{m\acute{a}x}$ aumento de 17 a 100 (mmol/L*h) y en el cultivo realizado a 0,5% de TOD la $VTO_{m\acute{a}x}$ aumento de 6 a 70 (mmol/L*h). Este aumento en la $VTO_{m\acute{a}x}$ mejora la producción de alginato, así como la productividad específica de alginato (q_{Alg}), alcanzando una concentración máxima de alginato de 3,1 [g/L] y una $q_{Alginato}$ de 0,031 (g/g*h) en los cultivos a $VTO_{m\acute{a}x}$ de 100 (mmol/L*h) (Lozano et al., 2011).

En contraste, el PMP del alginato aislado de cultivos desarrollados sin limitación de oxígeno, aumentó al disminuir la $VTO_{m\acute{a}x}$, alcanzando un máximo de 550 kDa a una $VTO_{m\acute{a}x}$ de 17 (mmol/L*h). Sin embargo, en los cultivos desarrollados con limitación de oxígeno, el PMP del polímero era prácticamente la misma (alrededor de 200 kDa) a 300 y 700 [rpm], y esto se mantuvo constante durante todo el cultivo (Lozano et al., 2011).

En Tabla 2.12 se muestra con más detalle cómo afecta la TOD y la velocidad de agitación a los parámetros cinéticos y PMP del alginato.

Tabla 2.12: PMP del alginato y parámetros cinéticos de *A. vinelandii* ATCC 9046 en función de la TOD y velocidad de agitación (Díaz-Barrera et al., 2007)

TOD [%]	Velocidad de agitación [rpm]	VTO [mmol O ₂ /L*h]	PMP [kDa]	μ [h ⁻¹]	Biomasa [g/L]	Alginato [g/L]
0,5	300	6	200	0,17	1,3	0,8
0,5	700	70	200	0,2	2,7	2,1
5	300	17	550 ± 120	0,15	1,4	0,6
5	700	100	160 ± 40	0,25	4,2	3,1

Finalmente se han realizado estudios donde se ha evaluado a nivel de quimiostato el efecto de la tensión de oxígeno disuelto (TOD) y la velocidad de dilución (D) sobre el cociente respiratorio (RQ), llegando a la conclusión que cuando la fuente de carbono (glucosa o sacarosa) es derivada a la producción de alginato, el valor teórico de RQ es cercano a 0,8, mientras que para la producción de PHB es de 1,33 (Sabra, Zeng, Sabry, Omar y Deckwer, 1999). Otros estudio evaluó el efecto de la velocidad de agitación sobre el cociente respiratorio (RQ), donde se indica que a mayor velocidad de agitación menor será el RQ de los cultivos. Además se indica que a valores bajos de RQ (0,95 a 200 [rpm]) se asocian con una mayor conversión de la fuente de carbono para alginato, mientras que los valores altos de RQ (1,21 a 100 [rpm]) son típicos cuando la fuente de carbono es derivado a PHB (Peña et al., 2011).

CAPÍTULO 3

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MICROORGANISMOS

Los microorganismos utilizados en este trabajo fueron las cepas *Azotobacter vinelandii* ATCC 9046 y la modificada AT12. La cepa de *A. vinelandii* ATCC 9046 fue utilizada como cepa control, la cual es capaz de producir dos biopolímeros de interés, estos son el PHB y el alginato. Mientras que *A. vinelandii* AT12 es una cepa modificada no productora de PHB, lo cual provocaría un aumento en producción de alginato.

Es importante señalar que la cepa de *A. vinelandii* AT12 utilizada fue proporcionada por el Dr. Carlos Peña del Instituto de Biotecnología, perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

3.2. MEDIOS DE CULTIVO

La composición del medio de cultivo para las cepas *A. vinelandii* ATCC 9046 y AT12 se muestra en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1: Composición de medio de cultivo para *A. vinelandii* ATCC 9046 y AT12 (Peña et al., 1997).

Solución	Compuesto	Concentración [g/L]	Marca	
1	Sacarosa/Glucosa	$C_{12}H_{22}O_{11}/C_6H_{12}O_6$	20 / 23,16	Merck
	Fosfato de potasio dibásico	K_2HPO_4	0,66	Merck
	Fosfato de potasio monobásico	KH_2PO_4	0,16	Merck
2	Sulfato de calcio	$CaSO_4$	0,05	Merck
3	Cloruro de sodio	$NaCl$	0,2	Winkler
	Sulfato de magnesio	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2	Winkler
	Molibdato de sodio	$NaMoO_4 \cdot 2H_2O$	0,0029	Winkler
	Sulfato de hierro	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,027	Merck

En el caso del medio de cultivo de la cepa AT12 se agregó kanamicina (marca Sigma) en concentración de 0,02 [g/L], para aislar la cepa AT12 (resistente de kanamicina) con respecto a la cepa ATCC 9046 (no resistente a kanamicina).

El pH se ajustara a 7,2 con una solución concentrada de NaOH 2 N. Con el objetivo de evitar precipitación, las tres soluciones (1,2 y 3 de la Tabla 3.1), se autoclavaron por separado al proceso de esterilización a 121 °C por 20 minutos en autoclave marca LabTech, modelo LAC-5100sD, mientras que la solución de kanamicina fue filtrada con una membrana de 0,22 [µm] y posteriormente congelada a -20 °C en eppendorf de 2 [mL] (con 1 [mL] de antibiótico) para matraces (50 [mL] de medio) y tubos para centrifuga de 50 [mL] (con 40 [mL] de antibiótico) para biorreactor (2 [L] de medio).

3.3. PREPARACIÓN DEL INÓCULO

Las cepas de *A. vinelandii* conservadas en ultrafreezer a -80°C fueron sembradas en placas con medio Burk modificado, utilizando la composición descrita en las Tablas 3.1 con agar (18 [g/L]), extracto de levadura (3 [g/L]) y kanamicina (sólo cepa AT12, 0,02 [g/L]), las cuales fueron incubadas en una estufa marca Memmert modelo 100-500 a 30°C durante 72 horas aproximadamente y posteriormente almacenadas a 4 °C. Luego se preparó un pre-inóculo utilizando la composición de medio correspondiente para cada cepa con 2 a 3 asadas del microorganismo desde la placa Petri, en un matraz Erlenmeyer de 250 [mL], con 50 [mL] de medio incubado en un shaker marca Labtech a 30°C con una velocidad de agitación de 200 [rpm]. Este procedimiento es necesario para la adaptación del microorganismo al pasar desde una fase solida a una fase liquida.

Posteriormente al alcanzar una concentración de biomasa adecuada y que el microorganismo se encuentre en fase de crecimiento (por aproximadamente 24 horas de cultivo) se procedió a realizar una propagación en matraces Erlenmeyer de mayor tamaño. Cada propagación se realizó bajo una campana de flujo laminar marca Lab Tech modelo LCB-0121V para evitar contaminación exterior.

Para la experiencia en matraces se tomaron 12 [mL] del pre-inoculo y se agregaron en un matraz Erlenmeyer de 500 [mL], con 120 [mL] de medio de cultivo, luego se procedió a inocular 20 matraces Erlenmeyer de 250 [mL] (50 [mL] de medio) con 5 [mL] de cultivo cada uno (Ver Figura 3.1).

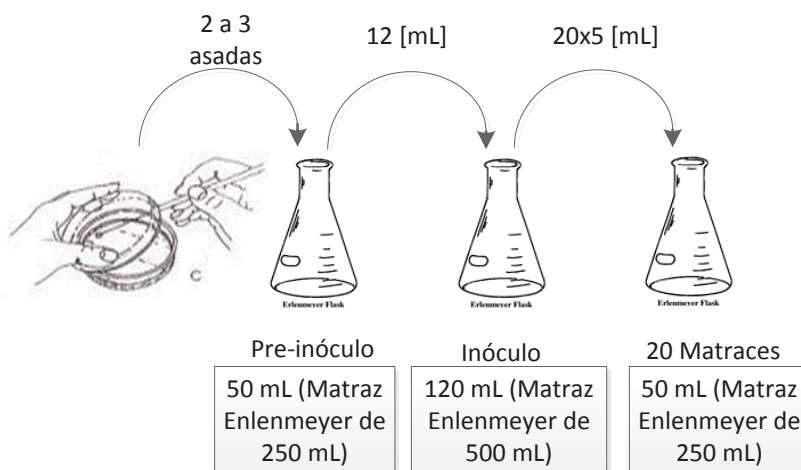


Figura 3.1: Propagaciones necesarias para la experiencia en matraces.

Para la experiencia en biorreactor se tomaron dos veces 10 [mL] del pre-inoculo y se agregaron en dos matraz Erlenmeyer de 500 [mL], con 100 [mL] de medio de cultivo, luego se procedió a inocular el biorreactor de 3 [L] (2 [L] de medio) con 200 [mL] de cultivo (Ver Figura 3.2).

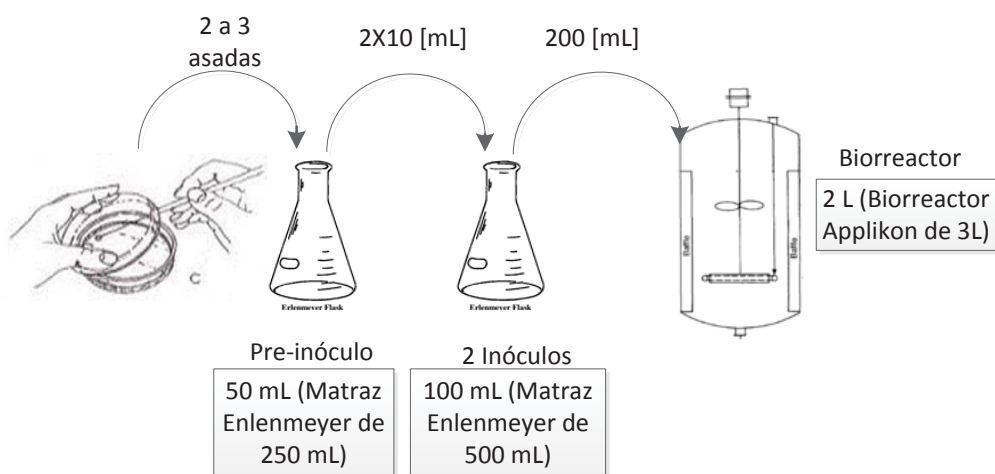


Figura 3.2: Propagaciones necesarias para la experiencia en biorreactor.

3.4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

En una primera etapa se realizó la puesta a punto de los métodos analíticos, tanto para la cepa de *Azotobacter vinelandii* salvaje (ATCC 9046) como mutante (AT12).

En una segunda etapa se procedió a caracterizar ambas cepas de *A. vinelandii* en matraces, utilizando sacarosa o glucosa como fuentes de carbono con la finalidad de evaluar el efecto de estas sobre la producción de alginato. Pues como se mostró en la Figura 2.3 estas dos fuentes de carbono tienen rutas metabólicas que derivan el flujo de carbono a la formación de alginato.

Para ello se diseñó un medio de cultivo en base a la equivalencia en gramos de carbono que proporcionan estos dos nutrientes. Para dicho estudio se fijó como base el medio burk modificado que tiene una concentración inicial de sacarosa de 20 [g/L] (8,4 g de carbono), lo cual equivale a adicionar una concentración inicial de glucosa monohidratada de 23,16 [g/L] como se mostró en la sección 3.2.

La cinética en matraces se realizó utilizando 10 matraces por duplicado en cultivos de 72 horas, de los cuales se tomó un matraz por punto cada 6 horas, tomando aproximadamente 25 [mL] de muestra por matraz. Además se realizó una medición de pH en los diferentes puntos de la cinética de crecimiento.

Las condiciones de cultivo para caracterizar ambas cepas de *A. vinelandii* en matraces se presenta en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2: Condición de cultivo para matraces

Matraces (Erlenmeyer de 250 mL)	
Volumen de cultivo [mL]	50
Fuente de Carbono	Sacarosa o Glucosa
Velocidad de agitación [rpm]	200
Temperatura [°C]	30
Tiempo de cultivo [h]	72
Condición de Nitrógeno	Fijando nitrógeno atmosférico

Con los resultados obtenidos en la segunda etapa se procederá a seleccionar la mejor condición de cultivo para la cepa AT12 en matraces, en base a la productividad específica de alginato (q_{Alg}) y rendimiento de alginato por unidad de biomasa ($Y_{Alg/X}$), asociado también a los demás parámetros cinéticos. Además se procederá a cuantificar una propiedad importante del alginato, la cual es el peso molecular.

Finalmente con la mejor condición de cultivo seleccionada se procederá a realizar una tercera etapa en biorreactor con la finalidad de evaluar el efecto de la velocidad de agitación sobre la producción de alginato y la velocidad de transferencia de oxígeno (VTO). En esta etapa se realizaran cultivos de la cepa AT12, los cuales se llevara a cabo en las condiciones de cultivo que se presenta en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3: Condiciones de cultivo para Biorreactor

Biorreactor (Applikon de 3 L)	
Volumen de cultivo [L]	2
Fuente de Carbono	Sacarosa
Velocidad de agitación [rpm]	300 - 500 – 700
Flujo de aire [L/min]	2
Temperatura [°C]	30
Tiempo de cultivo [h]	72
pH	7,0 ± 0,2
%TOD	Sin control
Condición de Nitrógeno	Fijando nitrógeno atmosférico

Para la cinética en biorreactor se tomaron 10 puntos con un volumen de muestra aproximadamente de 20 [mL] cada 6 horas en cultivos de 72 horas, para su posterior determinación de concentración de biomasa, sacarosa o glucosa, alginato, PHB y peso molecular del alginato.

Los cultivos fueron desarrollados a TOD libre y pH controlado con una solución de hidróxido de sodio 2 M, estos valores fueron analizados en línea con un electrodo de oxígeno (marca Mettler Toledo) y electrodo de pH (marca Mettler Toledo) conectados cada uno a su controlador y luego a una unidad central de procesamiento (CPU). El sistema experimental implementado se presenta en la Figura 3.3.

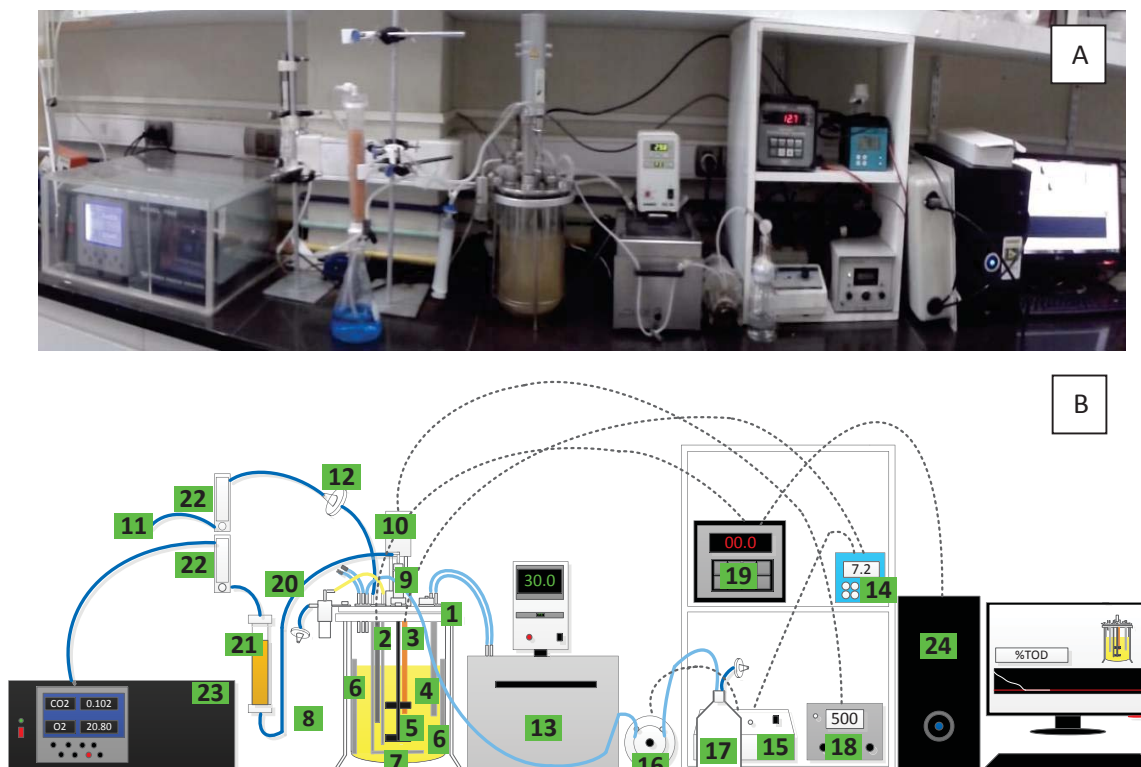


Figura 3.3: Fotografía (A) y esquema (B) del sistema experimental implementado

Tabla 3.4: Nomenclatura del sistema experimental implementado (Figura 3.3)

Número	Equipo o instrumento	Número	Equipo o instrumento
1	Biorreactor Applikon	13	Termostabilizador
2	Electrodo de oxígeno	14	Lector de pH
3	Electrodo de pH	15	Control de pH
4	Sistema de intercambiador de calor	16	Bomba para adicionar NaOH
5	Impulsor tipo turbina Rushton	17	Solución de NaOH 2 M
6	Baffles	18	Controlador del motor
7	Difusor de aire	19	Lector de TOD
8	Sistema de muestreo	20	Salida de gases del Biorreactor
9	Condensador	21	Columna desecadora de gases de salida
10	Motor	22	Rotámetro Cole Parmer
11	Entrada de aire al Biorreactor	23	Analizador de gases
12	Filtro de aire Millipore 0,22[μ m]	24	Computador para registro de TOD

En la Figura 3.4 se presenta un diagrama de la metodología experimental realizada en el laboratorio.

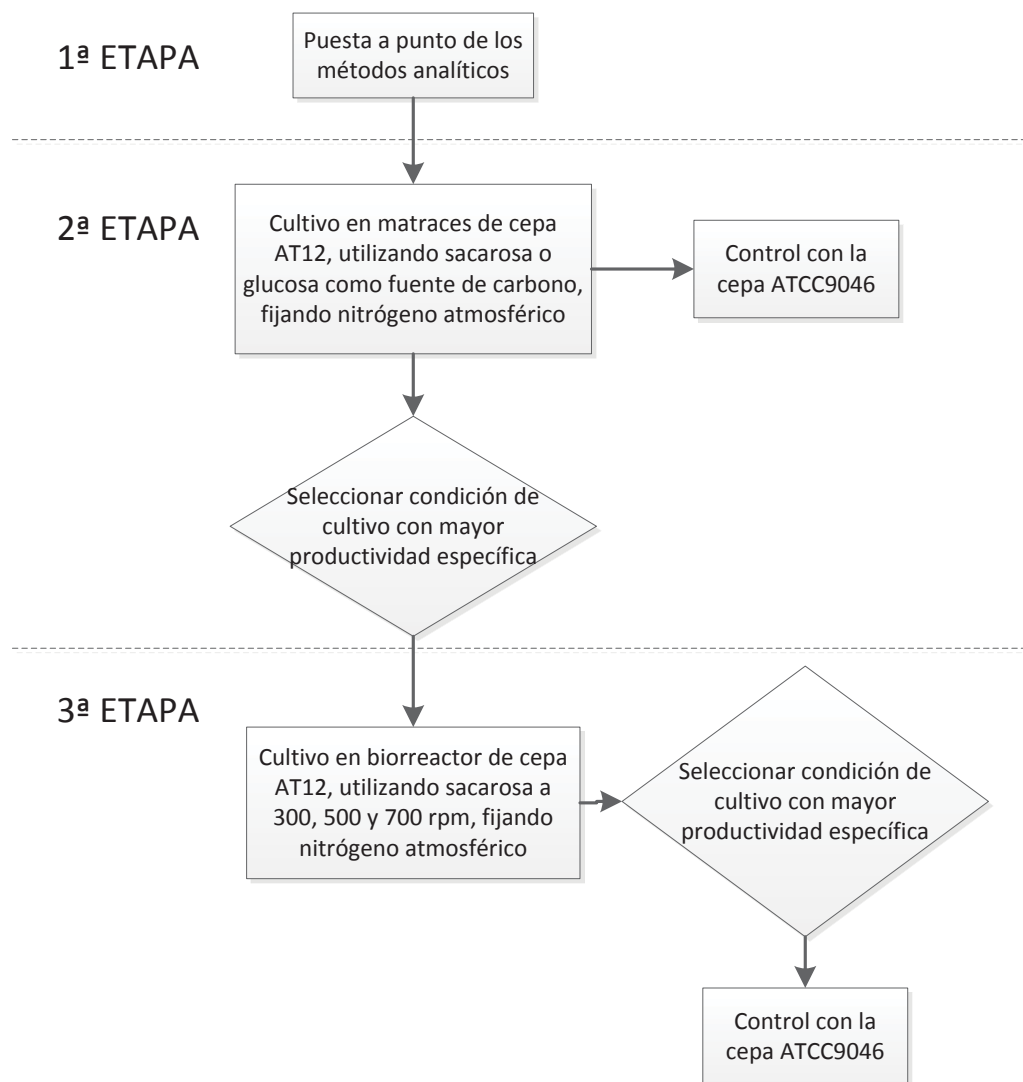


Figura 3.4: Diagrama de metodología experimental.

Para la realización de una cinética de cultivo fue necesario preparar un banco de cepa AT12 y ATCC 9046 en placas Petri, luego preparar un pre-inóculo e inóculo para la propagación como fue descrito en la sección 3.3.

3.5. MÉTODOS ANALÍTICOS

3.5.1. Determinación de concentración de biomasa

Método de turbidimetría

La concentración de biomasa se determinó mediante el método de turbidimetría, que logra obtener una relación entre absorbancia y concentración de biomasa, a través de la medición en un espectrofotómetro (marca UVmini-1240).

Para la medición de biomasa se tomó un volumen igual a 1 [mL] de caldo de cultivo y se diluyó entre 2 y 10 veces con agua destilada, posteriormente se midió absorbancia a 540 [nm] usando como blanco agua destilada. Los valores obtenidos de absorbancia se interpolaron en la curva de calibrado de biomasa (véase Apéndice A.1).

Método de peso seco

Para la medición de biomasa se tomaron 3 muestras de 10 [mL] de caldo de cultivo y se agregó 1 [mL] de EDTA 0,1 M (marca Merck) y 1 [mL] de NaCl 1 M (marca Winkler), posteriormente se centrifugó (marca ThermoScientific modelo SL-16R) a 10000 [rpm] durante 10 minutos. Luego se eliminó el sobrenadante y lavó el pellet con agua destilada, lo cual se repitió por 3 veces. Posteriormente se resuspendió el pellet con una pequeña cantidad de agua destilada y se depositó en capachos de aluminio previamente confeccionados (véase Apéndice A.1). Los capachos con las muestras se llevaron a la estufa de 105 °C (marca Memmert modelo 100-800) hasta obtener un peso contante y luego por diferencia se obtiene la concentración celular.

3.5.2. Determinación de concentración de sacarosa por invertasa-DNS y glucosa por DNS

Este método se basa en la hidrólisis de la sacarosa usando invertasa (marca Sigma) y la posterior medición de los azúcares reductores libres por la reducción con el ácido dinitrosalicílico (DNS), formando un complejo nitro-amino coloreado (amarillo), cuya densidad óptica es proporcional a la concentración de grupos reductores (Miller, 1959).

Para la determinación de la concentración de sacarosa y glucosa se tomó una alícuota de 1 [mL] de sobrenadante y se diluyó convenientemente, luego se tomaron 0,9 [mL] de cada dilución para la

determinación de sacarosa y se mezcló con 0,1 [mL] de la solución enzimática (véase Apéndice A.2) teniendo un volumen final de reacción de 1 [mL], los cuales se colocaron en tubos de ensayo a temperatura ambiente por 10 minutos.

Posteriormente se agregó 1 [mL] de reactivo DNS (véase Apéndice A.2) tanto para la dilución de sacarosa como glucosa, luego se taparon los tubos y se dispuso en un baño a ebullición por 5 minutos. Se retiraron los tubos del baño a ebullición y colocaron en un baño de hielo en donde se les agregó 10 [mL] de agua destilada a cada tubo. Finalmente se midió absorbancia de cada tubo a 540 [nm], usando como blanco la solución con sólo agua destilada. Los valores obtenidos de absorbancia se interpolaron en la curva de calibrado de sacarosa (véase Apéndice B.2) y glucosa (véase Apéndice B.3).

3.5.3. Extracción y cuantificación del alginato

La técnica utilizada es la precipitación del alginato con isopropanol y una posterior cuantificación gravimétrica del mismo (Peña et al., 1997). La técnica se lleva a cabo de la siguiente manera.

Para la medición de alginato se tomaron 10 [mL] de sobrenadante de caldo de cultivo y se adicionó 30 [mL] de isopropanol, previamente guardadas en refrigerador a 4 °C, luego se dejó reposar la solución por 30 minutos a 4 °C (refrigerador) para que se produzca la precipitación del alginato. Posteriormente la solución se filtró a vacío en membranas Millipore de 0,22 µm previamente secadas a 80°C hasta peso constante (pesado en una balanza analítica). Finalmente se colocaron las membranas en una desecadora por 10 minutos, luego se pesaron y por diferencia de peso se obtuvo la concentración de alginato.

3.5.4. Cuantificación de PHB

La cuantificación de PHB se llevó a cabo mediante la conversión a ácido crotónico por tratamiento con ácido sulfúrico y una posterior medición por HPLC acoplado a un detector UV, como se describe a continuación.

Se pesaron entre 2,5 y 3,5 [mg] de biomasa seca en tubos eppendorf de 2 [mL] y se le adicionó 1 [mL] de ácido sulfúrico concentrado (marca Tedia). La mezcla se incubó a 90 °C y 700 [rpm] durante 1 [h], en un Thermo-Shaker marca BIOSCAN TS-100 para hidrolizar la solución y obtener el ácido crotónico, el cual es un monómero del PHB. Finalmente, la solución resultante fue enfriada y diluida

convenientemente con agua destilada Milli Q. Se filtraron las muestras con filtros de jeringa de membrana de PDVF con un tamaño de poro de 0,22 [μm] y luego se analizaron las muestras ya filtradas por un sistema HPLC con una columna Aminex HPX-87H marca Bio-rad, acoplado a un detector UV Serie 200, marca Perkin Elmer.

La longitud de onda del detector UV fue de 215 [nm], con ácido sulfúrico 0,005 [M] como fase móvil, un volumen de inyección de 20 [μL] a una temperatura de trabajo de 35 $^{\circ}\text{C}$ y un flujo de 0,6 [mL/min]. El tiempo de corrida de cada muestra fue de 33 [min]. Los valores obtenidos se interpolaron a la curva de calibrado de ácido crotónico, que se describe en el Apéndice B.4.

3.5.5. Determinación del peso molecular del alginato

Para determinar el peso molecular del alginato se utilizó la técnica de HPLC con un detector de índice de refracción. La calibración de las columnas se llevó a cabo utilizando pululanos de *Aureobasidium pullulans*, con pesos moleculares en un rango de 22,8 a 778 [kDa] como estándares, de la marca Shodex STANDARD.

El procedimiento de preparación de muestras para el análisis de peso molecular por GPC será el similar al realizado para la extracción y cuantificación de alginato (Véase 3.5.4). Posteriormente las muestras de alginato secas se trituraron, pesaron y resuspendieron en una solución de nitrato de sodio 0,1 M hasta obtener una concentración final de 3 [mg/mL] de polisacárido para analizar, dejando reposar por 12 [h] para lograr una completa disolución. Finalmente se filtraron las muestras con filtros de jeringa de membrana de PDVF con un tamaño de poro de 0,22 [μm] y luego se analizaron las muestras ya filtradas por un sistema HPLC con una columna Ultrahydrogel 500 unida a Ultrahidrogel lineal (marca Waters), acoplado a un detector de índice de refracción a 45 $^{\circ}\text{C}$ (marca Waters).

Se utilizó nitrato de sodio 0,1 M como fase móvil, un volumen de inyección de 100 [μL], con una temperatura de trabajo de 35 $^{\circ}\text{C}$ y un flujo de 0,9 [mL/min] a una presión de 330 [psi]. El tiempo de corrida de cada muestra fue de 30 [min].

Los valores obtenidos se interpolaron a la curva de calibrado de pesos moleculares obtenidos con los estándares comerciales, que se encuentra detallada en el Apéndice B.5.

3.6. CÁLCULO DE LA VELOCIDAD DE TRANSFERENCIA DE OXÍGENO Y DIÓXIDO DE CARBONO

Para medir el contenido de oxígeno y dióxido de carbono en el flujo gaseoso de entrada y salida del reactor Se utilizó un analizador de gases (marca Teledyne Instruments, modelo 7500), el cual cuenta con un analizador infrarrojo para determinar CO₂ y un sensor paramagnético para determinar oxígeno. Este equipo se calibró a través de una corriente de gas con concentración conocida de dióxido de carbono (0,42 %) y aire seco para el oxígeno (20,9 %). Los ceros de ambos componentes fueron calibrados con nitrógeno.

Se acondicionó una columna con sílice para la remoción de la humedad del gas de salida del reactor antes de entrar al analizador y un rotámetro para mantener el flujo en un valor constante de 1 [L/min], como ya se esquematizó en la Figura 3.3.

La velocidad de transferencia de oxígeno (VTO) y la velocidad de transferencia de dióxido de carbono (VTCO₂) fueron determinadas a partir del análisis de gases y calculadas realizando balance de masa de la fase gaseosa (Kayser, Weber, Hecht y Rinas, 2005), como se muestra en la siguiente ecuación:

$$VTO = \frac{1000 * F_G^E}{V(t) V_M} \left(X_{O_2}^E(t) - X_{O_2}^S(t) \left(\frac{1 - X_{O_2}^E(t) - X_{CO_2}^E(t)}{1 - X_{O_2}^S(t) - X_{CO_2}^S(t)} \right) \right) \quad \text{Ecuación 3.1}$$

$$VTCO_2 = \frac{1000 * F_G^E}{V(t) V_M} \left(X_{CO_2}^S(t) \left(\frac{1 - X_{O_2}^E(t) - X_{CO_2}^E(t)}{1 - X_{O_2}^S(t) - X_{CO_2}^S(t)} \right) - X_{CO_2}^E(t) \right) \quad \text{Ecuación 3.2}$$

Donde:

VTO : Velocidad de transferencia de oxígeno [mmol O₂/L*h]

$VTCO_2$: Velocidad de transferencia de dióxido de carbono [mmol CO₂/L*h]

F_G^E : Flujo de aire a la entrada al reactor en condiciones estándares (1 [atm], 25 °C, [L/h])

$V(t)$: Volumen de trabajo del reactor [L]

V_M : Volumen molar del gas ideal en condiciones estándares (1 [atm], 25 °C, 24,4[L/mol])

$X_{O_2}^E(t)$: Fracción molar de O₂ a la entrada [mol O₂/mol aire]

$X_{O_2}^S(t)$: Fracción molar de O₂ a la salida [mol O₂/mol aire]

$X_{CO_2}^E(t)$: Fracción molar de CO₂ a la entrada [mol CO₂/mol aire]

$X_{CO_2}^S(t)$: Fracción molar de CO₂ a la salida [mol CO₂/mol aire]

Además se determinó el cociente respiratorio (RQ [mmol CO₂/ mmol O₂]), el cual se define como el cociente entre la VT_{CO_2} y VTO .

3.7. CÁLCULO DE VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO

La velocidad específica de crecimiento (μ) puntual se calculó en base a los ajustes de crecimiento de cada una de las cinéticas realizadas (ver Apéndices C.2 y C.3), las cuales se hicieron corren por 72 horas con intervalos de tiempo correspondiente a cada hora que se tomó la muestra. Utilizando la siguiente ecuación.

$$\mu = \frac{1}{X(t)} \frac{X(t) - X(t_0)}{(t - t_0)} \quad \text{Ecuación 3.3}$$

Donde:

μ : Velocidad específica de crecimiento [h⁻¹]

$X(t_0)$: Biomasa en el tiempo inicial [g/L]

$X(t)$: Biomasa en el tiempo final [g/L]

t : Tiempo final [h]

t_0 : Tiempo inicial [h]

3.8. CÁLCULO DE RENDIMIENTOS

Los rendimientos fueron calculados en base a los datos experimentales obtenidos en cada una de los cultivos realizados.

$$Y_{x/s} = \frac{X(t) - X(t_0)}{S(t_0) - S(t)} \quad \text{Ecuación 3.4}$$

$$Y_{Alg/S} = \frac{Alg(t) - Alg(t_0)}{S(t_0) - S(t)} \quad \text{Ecuación 3.5}$$

$$Y_{Alg/X} = \frac{Alg(t) - Alg(t_0)}{X(t) - X(t_0)} \quad \text{Ecuación 3.6}$$

Donde:

$Y_{X/S}$: Rendimiento de sustrato en biomasa [$\text{g}_{\text{biomasa}}/\text{g}_{\text{sustrato}}$]

$Y_{Alg/S}$: Rendimiento de sustrato en alginato [$\text{g}_{\text{alginato}}/\text{g}_{\text{sustrato}}$]

$Y_{Alg/X}$: Rendimiento de alginato por unidad de biomasa [$\text{g}_{\text{alginato}}/\text{g}_{\text{biomasa}}$]

$X(t_0)$: Biomasa en el tiempo inicial (0 hrs.) [g/L]

$X(t)$: Biomasa en el tiempo final (72 hrs.) [g/L]

$S(t_0)$: Sustrato en el tiempo inicial (0 hrs.) [g/L]

$S(t)$: Sustrato en el tiempo final (72 hrs.) [g/L]

$Alg(t_0)$: Alginato en el tiempo inicial (0 hrs.) [g/L]

$Alg(t)$: Alginato en el tiempo final (72 hrs.) [g/L]

3.9. CÁLCULO DE PRODUCTIVIDAD Y VELOCIDAD DE CONSUMO

Las productividades y velocidades de consumo de sustrato puntuales fueron calculadas en base a los ajustes de crecimiento, producción de alginato y consumo de sustrato de cada una de las cinéticas realizadas (ver Apéndices C.2 y C.3), las cuales se hicieron corren por 72 horas con intervalos de tiempo correspondiente a cada hora que se tomó la muestra.

$$Q_{Alg} = \frac{Alg(t) - Alg(t_0)}{(t - t_0)} \quad \text{Ecuación 3.7}$$

$$q_{Alg} = \frac{1}{X(t)} \frac{Alg(t) - Alg(t_0)}{(t - t_0)} \quad \text{Ecuación 3.8}$$

$$q_S = \frac{1}{X(t)} \frac{S(t) - S(t_0)}{(t - t_0)} \quad \text{Ecuación 3.9}$$

$$q_{O_2} = VTO_{max} / X(VTO_{max}) \quad \text{Ecuación 3.10}$$

$$q_{CO_2} = VT_{CO_2max} / X(VT_{CO_2max}) \quad \text{Ecuación 3.11}$$

Donde:

- Q_{Alg} : Productividad volumétrica de alginato [$g_{alginato} / L * h$]
 q_{Alg} : Productividad específica de alginato [$g_{alginato} / g_{biomasa} * h$]
 q_S : Velocidad específica de consumo de sustrato [$g_{sustrato} / g_{biomasa} * h$]
 q_{O_2} : Velocidad específica de consumo de oxígeno [$mmol O_2 / g * h$]
 q_{CO_2} : Velocidad específica de producción de dióxido de carbono oxígeno [$mmol CO_2 / g * h$]
 $X(t)$: Biomasa en el tiempo puntual [g/L]
 $S(t_0)$: Sustrato en el tiempo inicial [g/L]
 $S(t)$: Sustrato en el tiempo final [g/L]
 $Alg(t_0)$: Alginato en el tiempo inicial [g/L]
 $Alg(t)$: Alginato en el tiempo final [g/L]
 $VTO_{máx}$: Velocidad de transferencia de oxígeno máxima [$mmol O_2 / L * h$]
 $VTCO_{2máx}$: Velocidad de transferencia de dióxido de carbono máxima [$mmol CO_2 / L * h$]
 $X(VTO_{máx})$: Biomasa cuando VTO es máxima [g/L]
 $X(VTCO_{2máx})$: Biomasa cuando VT CO_2 es máxima [g/L]

3.10. BALANCE DE CARBONO

Durante los procesos de fermentación, el sustrato consumido (Sacarosa y Glucosa) se utiliza para el crecimiento celular, mantención de la viabilidad celular y producción de algún metabolito extracelular (Acevedo, Gentina e Illanes, 2002).

Para realizar un balance de masa se consideró que el carbono consumido como sustrato pasará a formar parte de la biomasa sin PHB, alginato, PHB y CO_2 , el cual es liberado como resultado de la respiración aerobia.

$$C_S = C_{B_R} + C_{Alg} + C_{PHB} + C_{CO_2} \quad \text{Ecuación 3.12}$$

Donde:

- C_S : Gramos de carbono en sustrato consumido [g]
 C_{B_T} : Gramos de carbono en biomasa total producida [g]
 C_{B_R} : Gramos de carbono en biomasa sin PHB producida [g]

C_{Alg} : Gramos de carbono en alginato producido [g]

C_{PHB} : Gramos de carbono en PHB producido [g]

C_{CO_2} : Gramos de carbono en CO_2 producido [g]

Estas cantidades de carbono, es el producto entre la masa obtenida por el porcentaje de carbono en dicho componente, como se muestra a continuación.

$$\begin{aligned}
 C_S &= S * \%C_S \\
 C_{B_T} &= B_T * \%C_B \\
 C_{B_R} &= B_R * \%C_B \\
 C_{Alg} &= Alg * \%C_{Alg} \\
 C_{CO_2} &= CO_2 * \%C_{CO_2}
 \end{aligned}$$

Ecuación 3.13

Donde:

S : Gramos de sustrato consumido [g]

B_T : Gramos de biomasa total producida [g]

B_R : Gramos de biomasa sin PHB producida [g]

Alg : Gramos de alginato producido [g]

CO_2 : Gramos de dióxido de carbono producido [g]

$\%C_S$: Porcentaje de carbono en sustrato

$\%C_B$: Porcentaje de carbono en biomasa (50 %)

$\%C_{Alg}$: Porcentaje de carbono en alginato (41,52 %)

$\%C_{CO_2}$: Porcentaje de carbono en CO_2

El C_{PHB} fue calculado en base a la siguiente ecuación.

$$C_{PHB} = C_{B_T} - C_{B_R}$$

Ecuación 3.14

Donde:

C_{PHB} : Gramos de carbono en PHB producido [g]

C_{B_T} : Gramos de carbono en biomasa total producida [g]

C_{B_R} : Gramos de carbono en biomasa sin PHB producida [g]

De manera general el porcentaje de carbono en cada componente se realizará de la siguiente manera:

$$\%C_X = \frac{M_C * a}{M_X} * 100 \quad \text{Ecuación 3.15}$$

Donde:

$\%C_X$: Porcentaje de carbono en cada componente

M_C : Peso atómico del carbono [g/mol]

M_X : Peso molecular de cada componente [g/mol]

a : Número de átomos de carbono presentes en la molécula de cada componente

CAPÍTULO 4

4. RESULTADOS

En primer lugar se presentaran los resultados obtenidos en fermentación en matraces y luego los resultados obtenidos en biorreactor, en las condiciones de cultivo mencionadas anteriormente en la sección 3.2.

4.1. CULTIVOS EN MATRACES DE LAS CEPAS *A. VINELANDII* ATCC 9046 Y AT12

4.1.1. Efecto de la sacarosa y glucosa como fuentes de carbono sobre la producción de biomasa, alginato, PHB y consumo de fuente de carbono

A continuación en la Figura 4.1 se presentan los resultados obtenidos para las cepas *Azotobacter vinelandii* ATCC 9046 y AT12, utilizando sacarosa o glucosa como fuente de carbono.

La concentración celular máxima para la cepa de *A. vinelandii* ATCC 9046 fue de 2,4 [g/L] a las 67 horas de cultivo utilizando sacarosa y de 2,7±0,1 [g/L] a las 68 horas utilizando glucosa, alcanzando una producción de alginato de 1,1±0,1 [g/L] utilizando sacarosa y de 1,0 [g/L] utilizando glucosa. En ambos cultivos quedo un remanente de la fuente de carbono, 10,0±0,5 de sacarosa y 9,5±0,1 de glucosa

Sin embargo para la cepa de *A. vinelandii* AT12 la concentración celular máxima fue de 1,4±0,1 [g/L] a las 66 horas de cultivo utilizando sacarosa y de 1,7±0,2 [g/L] a las 42 horas utilizando glucosa, alcanzando una producción de alginato máxima de 2,1±0,4 [g/L] utilizando sacarosa y de 1,9±0,2 [g/L] utilizando glucosa ambas al final del cultivo. En ambos cultivos quedo un remanente de la fuente de carbono, 14,6±1,1 de sacarosa y 13,7±0,8 glucosa, resultados que se presentan en la Figura 4.2.

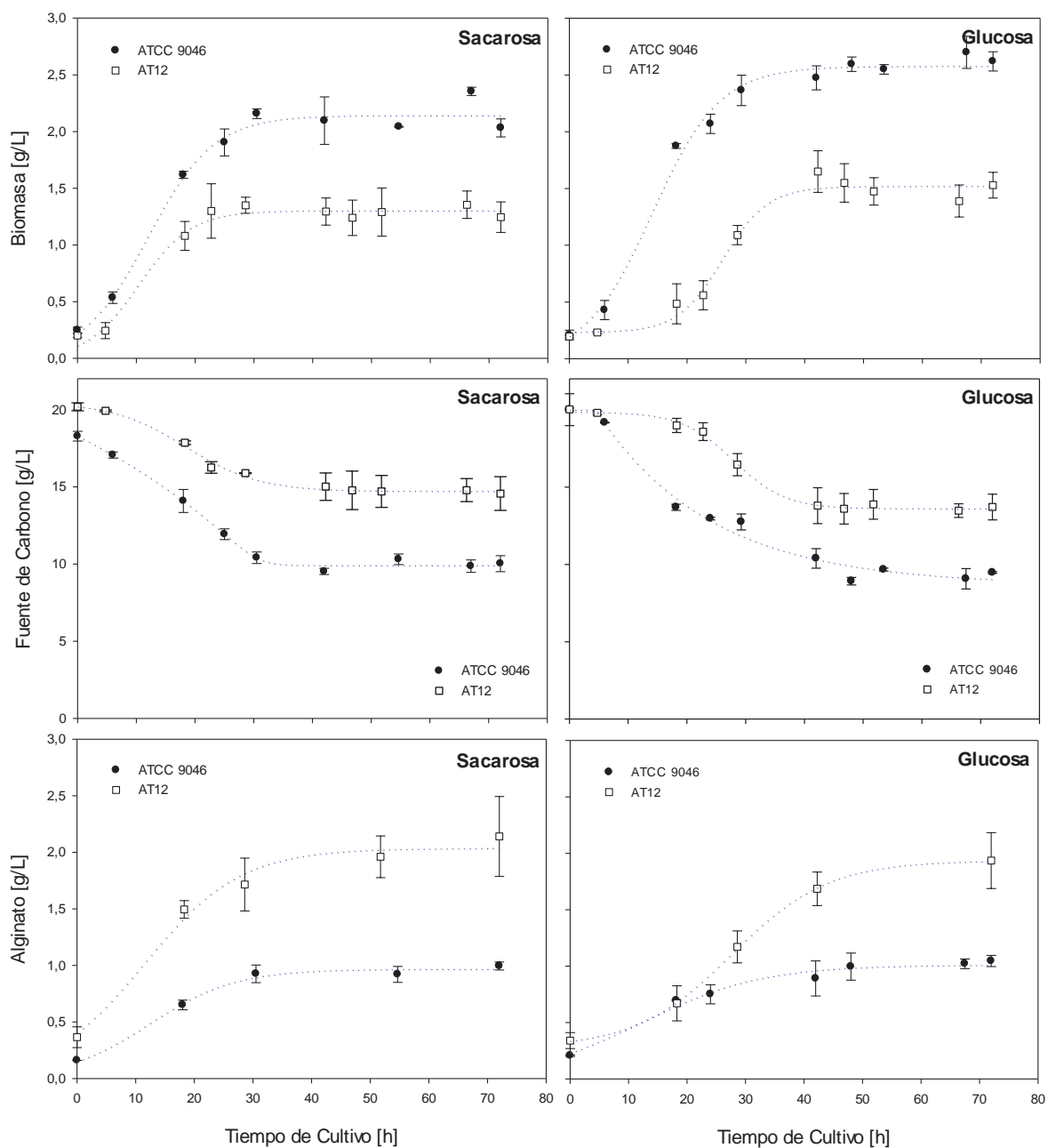


Figura 4.1: Cinética de crecimiento, consumo de fuente de carbono y producción de alginato en matraces de *A. vinelandii* ATCC 9046 y AT12, utilizando sacarosa o glucosa como fuente de carbono a 30°C y 200 [rpm].

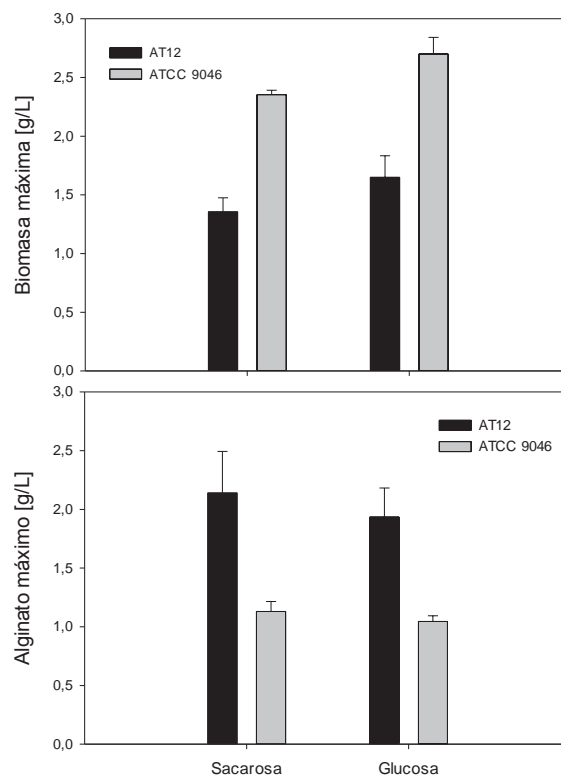


Figura 4.2: Comparación por fuente de carbono para las cepas *A. vinelandii* ATCC 9046 y AT12 en cuanto al crecimiento de biomasa máxima y producción de alginato máxima.

Para verificar que efectivamente la cepa *A. vinelandii* AT12 no sea productora de PHB, se procedió a cuantificar este biopolímero. En la Tabla 4.1 se presentan los valores de PHB [%p/p] y biomasa sin PHB en las cepas *A. vinelandii* ATCC 9046 y AT12, utilizando sacarosa o glucosa como fuente de carbono.

Con los resultados obtenidos se puede demostrar que la producción de PHB en la cepa modificada AT12 es muy baja con respecto a los obtenidos con la cepa nativa ATCC 9046. Ahora si observamos los valores de biomasa sin PHB se puede apreciar una similitud entre ambas cepas de *A. vinelandii*, ya que a pesar que la cepa nativa produzca más PHB, la biomasa sin PHB es similar para ambas cepas en la fase estacionaria.

Tabla 4.1: PHB (%p/p) y biomasa sin PHB en cepas *A. vinelandii* ATCC 9046 y AT12, utilizando sacarosa o glucosa como fuente de carbono.

Cepa	Fuente de carbono	PHB [%p/p]	Tiempo de Cultivo [h]	PHB [g/L]	Biomasa sin PHB [g/L]
ATCC 9046	Sacarosa	47,7 ± 0,5	49	1,25 ± 0,03	1,37 ± 0,00
		43,9 ± 4,1	67	1,03 ± 0,11	1,32 ± 0,08
	Glucosa	36,9 ± 2,7	42	0,92 ± 0,10	1,56 ± 0,00
		41,0 ± 7,1	72	1,07 ± 0,15	1,55 ± 0,24
AT12	Sacarosa	0,5 ± 0,3	42	0,01 ± 0,00	1,29 ± 0,12
		0,6 ± 0,1	72	0,01 ± 0,00	1,24 ± 0,13
	Glucosa	0,9 ± 0,2	42	0,01 ± 0,00	1,64 ± 0,19
		1,4 ± 0,3	72	0,02 ± 0,00	1,51 ± 0,12

A continuación en las Tablas 4.2 se presentan los principales parámetros cinéticos obtenidos para las cepas *Azotobacter vinelandii* ATCC 9046 y AT12, utilizando sacarosa o glucosa como fuente de carbono.

Tabla 4.2: Parámetros cinéticos de las cepas *A. vinelandii* ATCC 9046 y AT12, utilizando sacarosa o glucosa como fuente de carbono.

Cepa	Fuente de carbono	$Y_{X/S}$ [gbiomasa/gsustrato]	$Y_{Alg/S}$ [galginato/gsustrato]	$Y_{Alg/X}$ [galginato/gbiomasa]	$Y_{X/S}$ [gbiomasa sin PHB/gsustrato]	$Y_{Alg/X}$ [galginato/gbiomasa sin PHB]
ATCC 9046	Sacarosa	0,22 ± 0,02	0,10 ± 0,01	0,47 ± 0,01	0,13 ± 0,02 (67 hrs.)	0,91 ± 0,17 (67 hrs.)
	Glucosa	0,23 ± 0,04	0,08 ± 0,00	0,35 ± 0,04	0,13 ± 0,04	0,64 ± 0,17
AT12	Sacarosa	0,19 ± 0,07	0,29 ± 0,04	1,53 ± 0,34	0,19 ± 0,07	1,56 ± 0,35
	Glucosa	0,21 ± 0,04	0,25 ± 0,00	1,21 ± 0,24	0,21 ± 0,04	1,23 ± 0,25

Los resultados presentados en la Tabla 4.2 muestran un rendimiento de alginato por unidad de biomasa aproximadamente 3 veces mayor al utilizar la cepa modificada AT12 para ambas fuentes de carbono cuando se considera el PHB como parte de la biomasa total. Sin embargo cuando el PHB no se considera parte de la biomasa, el rendimiento de alginato por unidad de biomasa es aproximadamente 2 veces mayor con la cepa modificada AT12 con ambas fuentes de carbono.

A continuación en la Tabla 4.3 se presentan las productividades y velocidades de consumo obtenidos para las cepas *Azotobacter vinelandii* ATCC 9046 y AT12, utilizando sacarosa o glucosa como fuente de carbono.

Tabla 4.3: Productividades y velocidad de consumo de sustrato de las cepas *A. vinelandii* ATCC 9046 y AT12, utilizando sacarosa o glucosa como fuente de carbono.

Cepa	Fuente de carbono	Q_{Alg} máximo [g _{alginato} /L*h]	q_{Alg} [g _{alginato} /g _{biomasa} *h]	Biomasa [g/L]	Alginato [g/L]	q_S máximo [g _{sustrato} /g _{biomasa} *h]
ATCC 9046	Sacarosa	0,029 (18 hrs.)	0,018 (18 hrs.)	1,60 (18 hrs.)	0,66 (18 hrs.)	0,155 (18 hrs.)
	Glucosa	0,023 (18 hrs.)	0,013 (18 hrs.)	1,74 (18 hrs.)	0,65 (18 hrs.)	0,228(18 hrs.)
AT12	Sacarosa	0,056 (18 hrs.)	0,050 (18 hrs.)	1,12 (18 hrs.)	1,42 (18 hrs.)	0,181 (23 hrs.)
	Glucosa	0,032 (42 hrs.)	0,021 (42 hrs.)	1,50 (42 hrs.)	1,70 (42 hrs.)	0,298 (29 hrs.)

Los resultados expuestos en la Tabla 4.3 fueron calculados en base a los ajustes de crecimiento de biomasa, consumo de la fuente de carbono y producción de alginato representados con una línea punteada en la Figura 4.1 (ver ajuste en Apéndice C.2).

De acuerdo a los resultados obtenidos con la cepa *A. vinelandii* ATCC 9046 los mayores valores de q_{Alg} fueron alcanzados al utilizar sacarosa como fuente de carbono a las 18 horas de cultivo (0,018 [g_{alginato}/g_{biomasa}*h]), en comparación a glucosa (0,013 [g_{alginato}/g_{biomasa}*h]). Del mismo modo, los mayores $Y_{Alg/X}$ se obtuvieron en los cultivos realizados con sacarosa como fuente de carbono a las 18 horas de cultivo (0,47±0,01 [g_{alginato}/g_{biomasa}] y 0,91±0,17 [g_{alginato}/g_{biomasa} sin PHB]), en comparación a glucosa (0,35±0,04 [g_{alginato}/g_{biomasa}] y 0,64±0,17 [g_{alginato}/g_{biomasa} sin PHB]). Por el contrario, los mayores valores de q_S fueron al utilizar glucosa como fuente de carbono a las 18 horas de cultivo (0,228 [g_{sustrato}/g_{biomasa}*h]), en comparación a sacarosa en el mismo tiempo de cultivo (0,155 [g_{sustrato}/g_{biomasa}*h]).

Por otro lado de acuerdo a los resultado obtenido con la cepa *A. vinelandii* AT12 los mayores valores de q_{Alg} también fueron alcanzados al utilizar sacarosa como fuente de carbono a las 18 horas de cultivo (0,05 [g_{alginato}/g_{biomasa}*h]), en comparación a glucosa (0,021 [g_{alginato}/g_{biomasa}*h]) a las 42 horas de cultivo, ya que al utilizar glucosa se observó una fase de adaptación o fase lag notoriamente más larga que al utilizar sacarosa. Así mismo, los mayores $Y_{Alg/X}$ se obtuvieron en los cultivos realizados con sacarosa como fuente de carbono (1,53±0,34 [g_{alginato}/g_{biomasa}] y 1,56±0,35 [g_{alginato}/g_{biomasa} sin PHB]), en

comparación a glucosa ($1,21 \pm 0,24$ [$\text{g}_{\text{alginato}}/\text{g}_{\text{biomasa}}$] y $1,23 \pm 0,25$ [$\text{g}_{\text{alginato}}/\text{g}_{\text{biomasa sin PHB}}$]). Por el contrario, al igual que lo observado con la cepa salvaje, los mayores valores de q_S fueron al utilizar glucosa como fuente de carbono a las 29 horas de cultivo ($0,298$ [$\text{g}_{\text{sustrato}}/\text{g}_{\text{biomasa}} \cdot \text{h}$]), en comparación a sacarosa a las 23 horas de cultivo ($0,181$ [$\text{g}_{\text{sustrato}}/\text{g}_{\text{biomasa}} \cdot \text{h}$]).

Se ha reportado que *Azotobacter* presentan una alta tasa de respiración y pueden crecer en condiciones de bajas concentraciones de oxígeno (Espín, 2002), esto indicaría que los cultivos tienen una condición de limitación de oxígeno, lo cual conlleva a que la velocidad específica de crecimiento no sea constante durante la fermentación. Por lo tanto se procedió a calcular este parámetro cinético en el tiempo de crecimiento con los ajustes de las cinéticas de las cepas *A. vinelandii* ATCC 9046 y AT12 (ver Apéndice C.2), los cuales se presentan en la Figura 4.3.

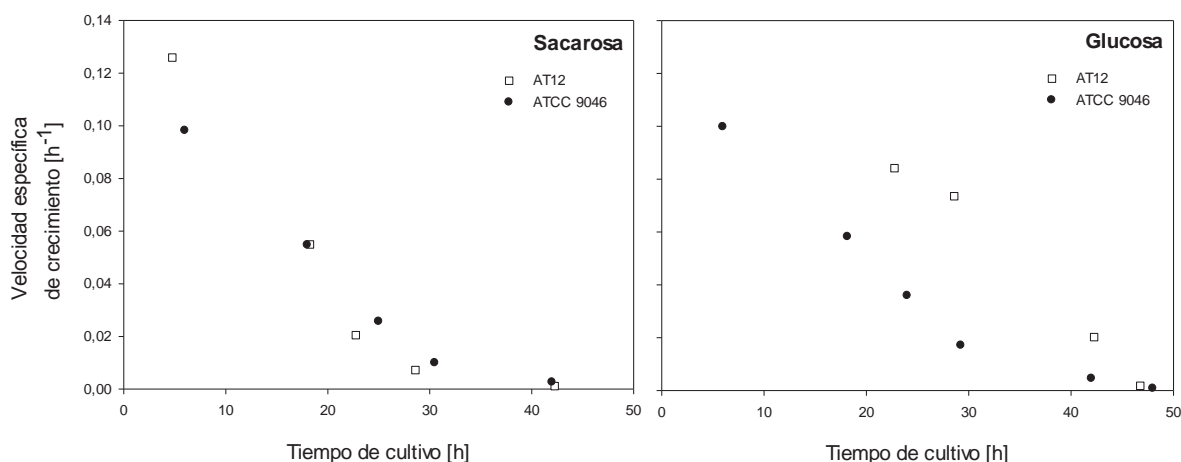


Figura 4.3: Velocidad específica de crecimiento de las cepas *A. vinelandii* ATCC 9046 y AT12, utilizando sacarosa o glucosa como fuente de carbono a 30°C y 200 [rpm].

A continuación en la Figura 4.4 se presenta los pesos moleculares promedios del alginato a diferentes puntos de las cinéticas y en la Tabla 4.4 se presenta el rango de peso molecular promedio del alginato para las cepas *Azotobacter vinelandii* ATCC 9046 y AT12, utilizando sacarosa o glucosa como fuente de carbono.

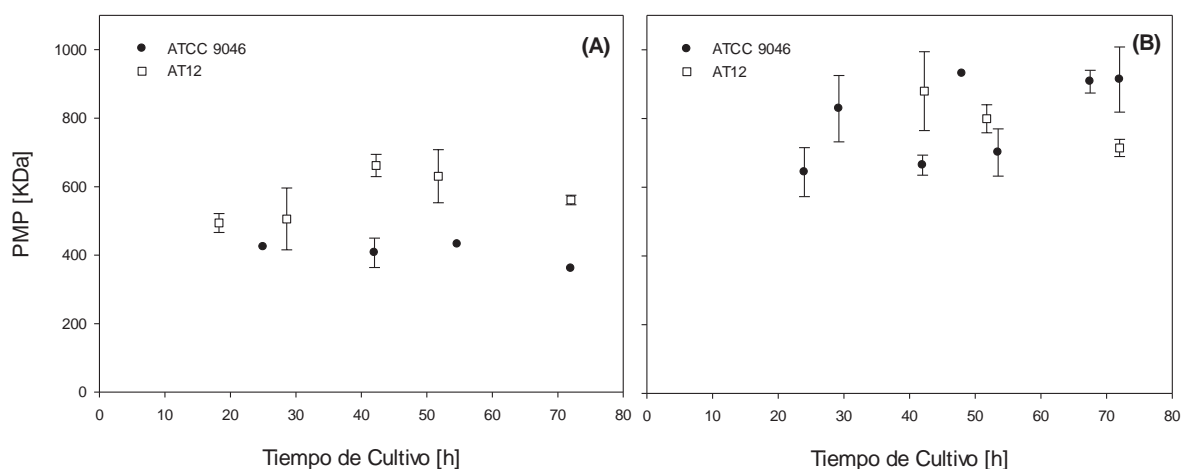


Figura 4.4: Peso molecular promedio del alginato en cultivos en matraces de *A. vinelandii* ATCC 9046 y AT12, utilizando sacarosa o glucosa como fuente de carbono a 30°C y 200 [rpm].

Tabla 4.4: PMP máximos de alginato para las cepas *A. vinelandii* ATCC 9046 y AT12, utilizando sacarosa o glucosa como fuente de carbono.

Cepa	Fuente de carbono	PMP máximo [KDa]
ATCC 9046	Sacarosa	407,0±42,96
	Glucosa	930,7±
AT12	Sacarosa	630,4±77,4
	Glucosa	879,7±114,7

Como se puede apreciar existe una diferencia con respecto al peso molecular promedio al utilizar sacarosa o glucosa como fuentes de carbono, alcanzando los mayores valores de PMP al utilizar glucosa para ambas cepas de *A. vinelandii*. También se observa que en todos los cultivos realizados el peso molecular promedio se mantiene relativamente constante durante toda la fermentación.

A continuación en la Figura 4.5 se presentan los valores de pH en diferentes puntos de las cinéticas para ambas cepas de *A. vinelandii* utilizando sacarosa o glucosa como fuente de carbono.

Con los resultados expuesto en la Figura 4.5 se aprecia la influencia del pH sobre el crecimiento de *A. vinelandii*. Para los cultivos de la cepa ATCC 9046 se observa que con ambas fuentes de carbono la caída de pH es de manera gradual en la fase de crecimiento llegando a valores de pH cercanos a 5 y 5,2 al utilizar sacarosa y glucosa respectivamente, en aproximadamente 45 horas de cultivo.

Para los cultivos de la cepa AT12 se observa una caída de pH más inmediata en la fase de crecimiento, llegando a valores cercanos a 5,3 y 5,4 al utilizar sacarosa y glucosa respectivamente, en aproximadamente 25 horas de cultivo.

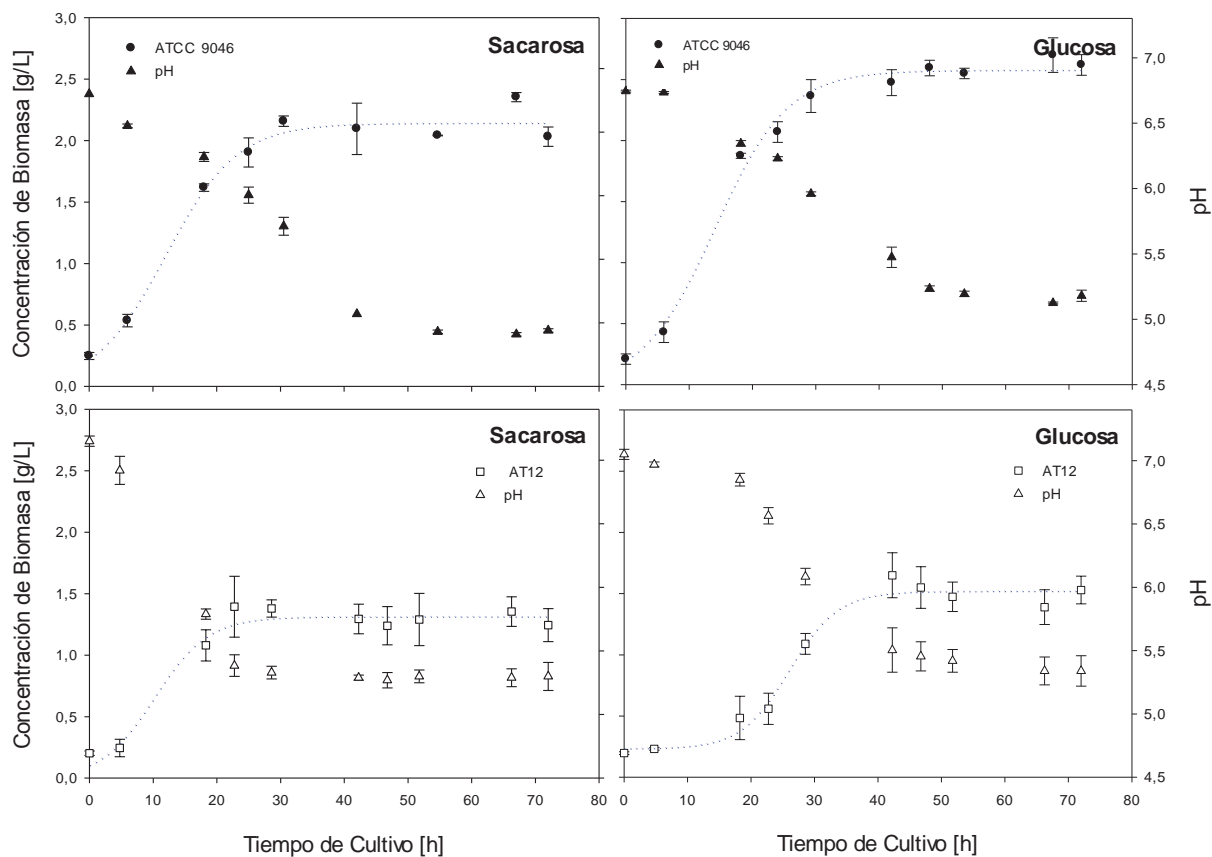


Figura 4.5: Valores de pH en el transcurso de los cultivos de *A. vinelandii* ATCC 9046 y AT12, utilizando sacarosa o glucosa como fuente de carbono a 30°C y 200 [rpm].

4.2. CULTIVOS EN BIORREACTOR DE LAS CEPAS *A. VINELANDII* AT12

4.2.1. Efecto de la velocidad de agitación sobre la producción de biomasa, alginato, PHB y consumo de sacarosa

A continuación en la Figura 4.6 se presentan los resultados obtenidos para la cepa *Azotobacter vinelandii* AT12, utilizando sacarosa fuente de carbono a diferentes velocidades de agitación.

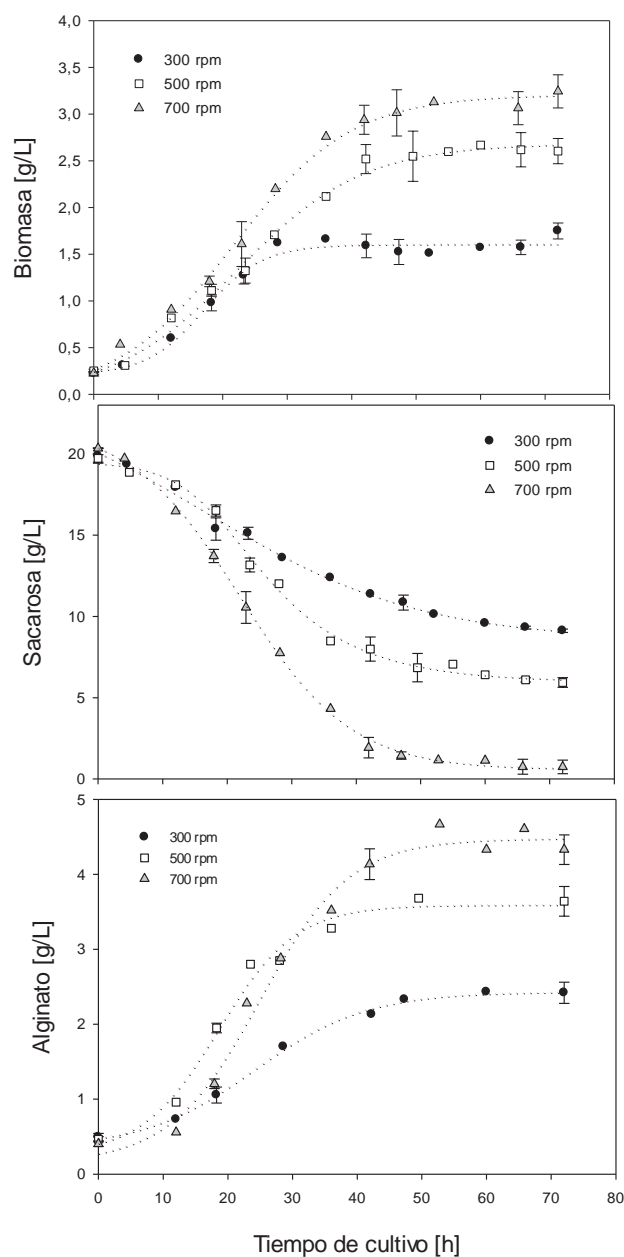


Figura 4.6: Cinética de crecimiento, consumo de sacarosa y producción de alginato en Biorreactor de *A. vinelandii* AT12 a 300, 500 y 700 [rpm], 30°C y 1vvm.

Se utilizó sacarosa, ya que con esta fuente de carbono en la experiencia en matraces se obtuvo la mayor productividad específica de alginato ($0,05 \text{ [g}_{\text{alginato}}/\text{g}_{\text{biomasa}} \cdot \text{h}]$) y rendimiento de alginato por unidad de biomasa ($1,53 \pm 0,34 \text{ [g}_{\text{alginato}}/\text{g}_{\text{biomasa}}]$).

En los cultivos realizados a 300 [rpm] la concentración celular máxima fue de $1,75 \pm 0,08 \text{ [g/L]}$ a las 72 horas de cultivo, alcanzando una producción de alginato de $2,42 \pm 0,14 \text{ [g/L]}$ y un remanente de sacarosa de $9,12 \pm 0,10 \text{ [g/L]}$. En los cultivos realizados a 500 [rpm] la concentración celular máxima fue de $2,60 \pm 0,13 \text{ [g/L]}$ a las 72 horas de cultivo, alcanzando una producción de alginato de $3,64 \pm 0,42 \text{ [g/L]}$ y un remanente de sacarosa de $5,93 \pm 0,30 \text{ [g/L]}$. Finalmente los cultivos realizados a 700 [rpm] la concentración celular máxima fue de $3,24 \pm 0,18 \text{ [g/L]}$ a las 72 horas de cultivo, alcanzando una producción de alginato de $4,67 \text{ [g/L]}$ y un remanente de sacarosa de $0,74 \pm 0,41 \text{ [g/L]}$, resultados que se presentan en la Figura 4.7.

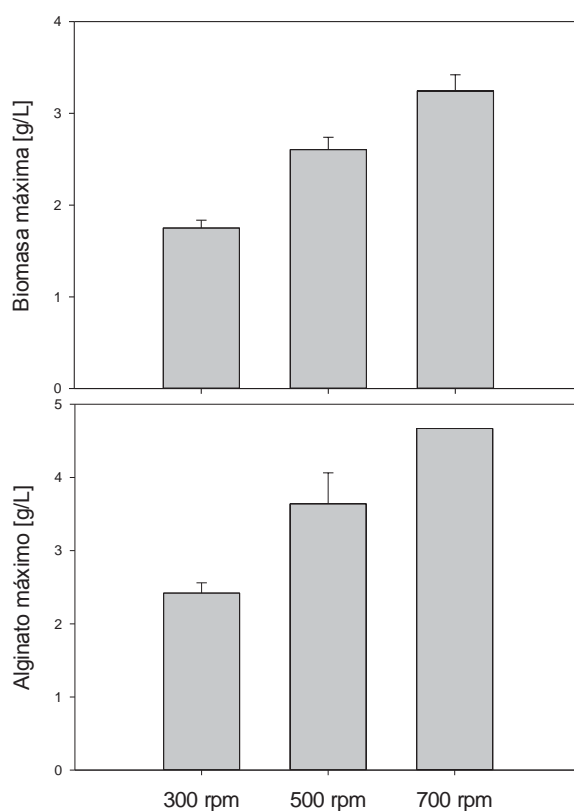


Figura 4.7: Comparación por velocidad de agitación para la cepa de *A. vinelandii* AT12 en cuanto al crecimiento de biomasa máxima y producción de alginato máxima.

En la Figura 4.7 se puede observar que a medida que se aumenta la velocidad de agitación también hay un aumento de la concentración de biomasa y alginato. Si tomamos como referencia el cultivo

desarrollado a 500 [rpm], este cultivo en cuanto a concentración de biomasa máxima, alcanzo 36,7% más que el cultivo a 300 [rpm] y 26,2% menos que el cultivo a 700 [rpm]. En términos de producción de alginato máxima el cultivo a 500 [rpm] produjo 37,0% más que el cultivo a 300 [rpm] y 32,3% menos que el cultivo a 700 [rpm].

Se procedió a cuantificar el PHB (%p/p) y biomasa sin PHB en la cepa *A. vinelandii* AT12, a diferentes velocidades de agitación en la fase de crecimiento y estado estacionario, los cuales se presentan en la Tabla 4.5.

Tabla 4.5: PHB (%p/p) y biomasa sin PHB para las cepas *A. vinelandii* AT12, a diferentes velocidades de agitación.

Velocidad de agitación [rpm]	PHB [%p/p]	Tiempo de Cultivo [h]	PHB [g/L]	Biomasa sin PHB [g/L]
300	4,7	29	0,06	1,54
	4,2	72	0,09	1,53
500	4,6	24	0,08	1,17
	3,4	72	0,09	2,52
700	3,2	42	0,10	2,95
	0,3	72	0,01	3,18

De acuerdo a los resultados expuestos se aprecia que la cepa *A. vinelandii* AT12 produce una bajo porcentaje de PHB y que a velocidades de agitación baja se obtuvo mayor porcentaje de PHB al final del cultivo, aunque en concentración de PHB se obtienen valores similares. Esto se puede explicar, ya que a velocidades de agitación más altas se obtuvo una mayor concentración de biomasa, por lo cual en concentración de PHB se alcanzaron valores similares a las tres condiciones trabajadas. Además se aprecia que al realizar cultivos de la cepa *A. vinelandii* AT12 en biorreactor se alcanzó un mayor porcentaje de PHB, que al realizar cultivos en matraces.

A continuación en las Tablas 4.6 se presentan los principales parámetros cinéticos y en la Tabla 4.7 las productividades y velocidad de consumo de sacarosa obtenidos para la cepa *Azotobacter vinelandii* AT12 a diferentes velocidades de agitación.

Los resultados expuestos en la Tabla 4.7 fueron calculados en base a los ajustes de crecimiento de biomasa, consumo de la fuente de carbono y producción de alginato representados con la línea punteada en la Figura 4.4 (ver ajuste en Apéndice C.3).

Tabla 4.6: Parámetros cinéticos de las cepas *A. vinelandii* AT12, a diferentes velocidades de agitación.

Velocidad de agitación [rpm]	$Y_{X/S}$ [gbiomasa/gsacarosa]	$Y_{Alg/S}$ [galginato/gsacarosa]	$Y_{Alg/X}$ [galginato/gbiomasa]	$Y_{X/S}$ [gbiomasa sin PHB /gsacarosa]	$Y_{Alg/X}$ [galginato/ gbiomasa sin PHB]
300	0,14 ± 0,02	0,18 ± 0,02	1,26 ± 0,03	0,14 ± 0,03	1,34 ± 0,14
500	0,17 ± 0,00	0,23 ± 0,02	1,37 ± 0,08	0,16 ± 0,00	1,40 ± 0,12
700	0,15 ± 0,01	0,22 ± 0,02	1,30 ± 0,01	0,15 ± 0,01	1,34 ± 0,05

Tabla 4.7: Productividades y velocidad de consumo de sacarosa de las cepas *A. vinelandii* AT12, a diferentes velocidades de agitación.

Velocidad de agitación [rpm]	Q_{Alg} máximo [galginato /L*h]	q_{Alg} [galginato/gbiomasa *h]	Biomasa [g/L]	Alginato [g/L]	q_S máximo [gsacarosa/gbiomasa *h]
300	0,041 (29 hrs)	0,027 (29 hrs)	1,51 (29 hrs)	1,66 (29 hrs)	0,224 (18 hrs)
500	0,094 (28 hrs)	0,054 (28 hrs)	1,73(28 hrs)	3,03 (28 hrs)	0,331 (24 hrs)
700	0,092 (42 hrs)	0,042 (28 hrs)	2,17 (28 hrs)	2,83 (28 hrs)	0,354 (23 hrs)

Con respecto a la q_{Alg} el máximo valor fue alcanzado en los cultivos realizados a 500 [rpm] a las 28 horas de cultivo (0,054 [galginato/gbiomasa *h]). Por otro lado, el mayor $Y_{Alg/X}$ también fue alcanzado a 500 [rpm] (1,37 ± 0,08 [galginato/gbiomasa] y 1,40 ± 0,12 [galginato/ gbiomasa sin PHB]), aunque a las otras condiciones de cultivo trabajadas se observaron valores cercanos (Tabla 4.6), lo cual indicaría que la velocidad de agitación no afecto significativamente este parámetro.

Al igual que los cultivos en matraces, en la Figura 4.8 se presentaran los resultados de la velocidad específica de crecimiento en el tiempo de la cepa *A. vinelandii* AT12 con los ajustes de las cinéticas de la cepa *A. vinelandii* AT12, a diferentes velocidades de agitación.

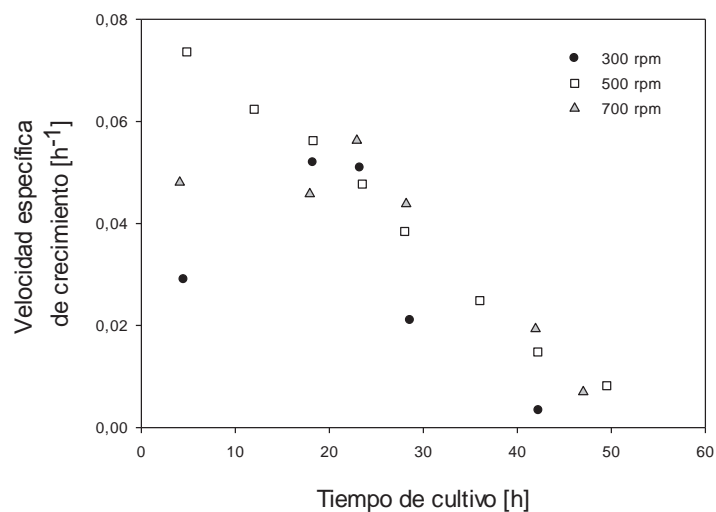


Figura 4.8: Velocidad específica de crecimiento de la cepa *A. vinelandii* AT12, a 300, 500 y 700 [rpm], 30°C y 1vvm.

En la Figura 4.9 se presenta los pesos moleculares promedios del alginato a diferentes puntos de las cinéticas y en la Tabla 4.8 se presenta el peso molecular promedio máximo del alginato para la cepa *A. vinelandii* AT12, a diferentes velocidades de agitación.

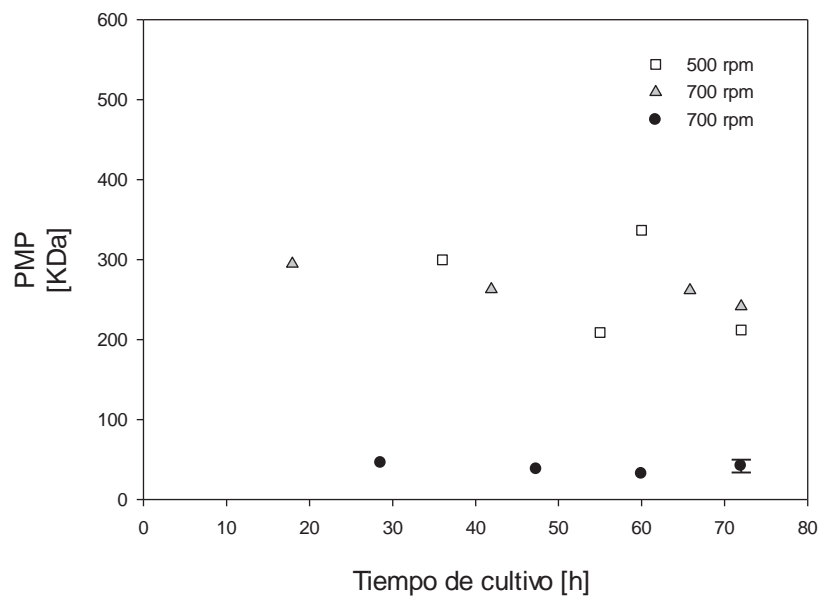


Figura 4.9: Peso molecular promedio del alginato en cultivos en biorreactor de *A. vinelandii* AT12, a 300, 500 y 700 [rpm], 30°C y 1vvm.

Tabla 4.8: PMP máximo del alginato para la cepa *A. vinelandii* AT12, a diferentes velocidades de agitación.

Velocidad de agitación [rpm]	PMP máximo [KDa]
300	46
500	337
700	295

4.2.2. Efecto de la velocidad de agitación sobre la tensión de oxígeno disuelto (TOD), la velocidad de transferencia de oxígeno (VTO) y dióxido de carbono (VTCO₂)

En la Figura 4.10 se presenta los perfiles de TOD, para cultivos de *A. vinelandii* AT12 a diferentes velocidades de agitación.

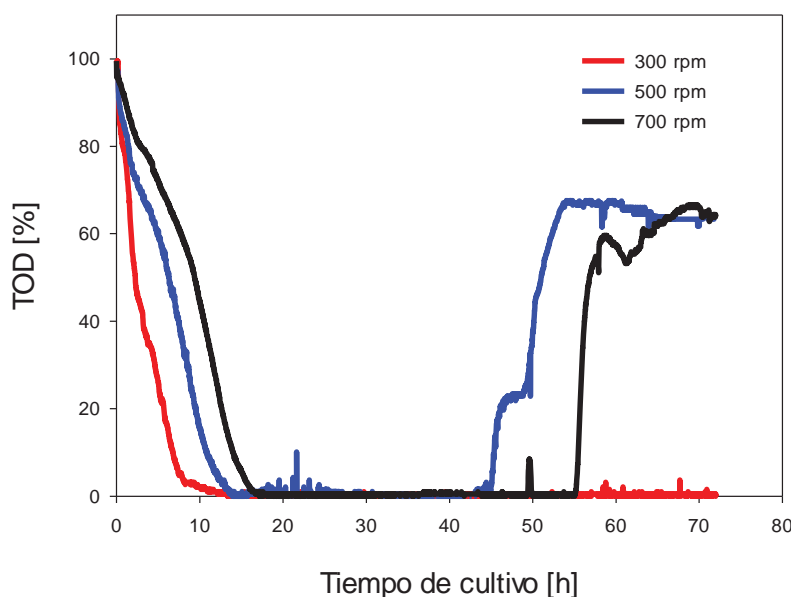


Figura 4.10: Perfiles de TOD en cultivos en biorreactor de *A. vinelandii* AT12, a 300, 500 y 700 [rpm], 30°C y 1vvm.

Con los perfiles de TOD expuestos en la Figura 4.10 se aprecia un claro efecto de la velocidad de agitación sobre la TOD, en cuanto al tiempo que demora cada cultivo hasta llegar a una TOD de cero y en la duración que esta se mantiene durante el cultivo, resultados que concuerdan con lo anteriormente reportado (Díaz-Barrera et al., 2007; Lozano et al., 2011).

Los cultivos realizados a una baja velocidad de agitación (300 [rpm]) tienden a descender más rápidamente (12 hrs.) que en cultivos desarrollados a altas velocidades (700 [rpm]) (17 hrs.). En cultivos desarrollados a 500 [rpm] el tiempo que se mantuvo la TOD en cero fue de aproximadamente de 31 horas, para cultivos desarrollados a 700 [rpm] fue aproximadamente de 38 horas. Para los cultivos llevados a cabo a 500 [rpm] la TOD subió en el instante que el cultivo alcanzó la fase estacionaria, mientras que para las otras condiciones la TOD subió tardíamente, cuando el cultivo estaba en fase estacionaria o simplemente no se evidenció una subida de la TOD durante todo el cultivo, el cual fue el caso del cultivo a 300 [rpm].

A continuación en las Figura 4.11 se presentan los perfiles de VTO y de VT_{CO_2} .

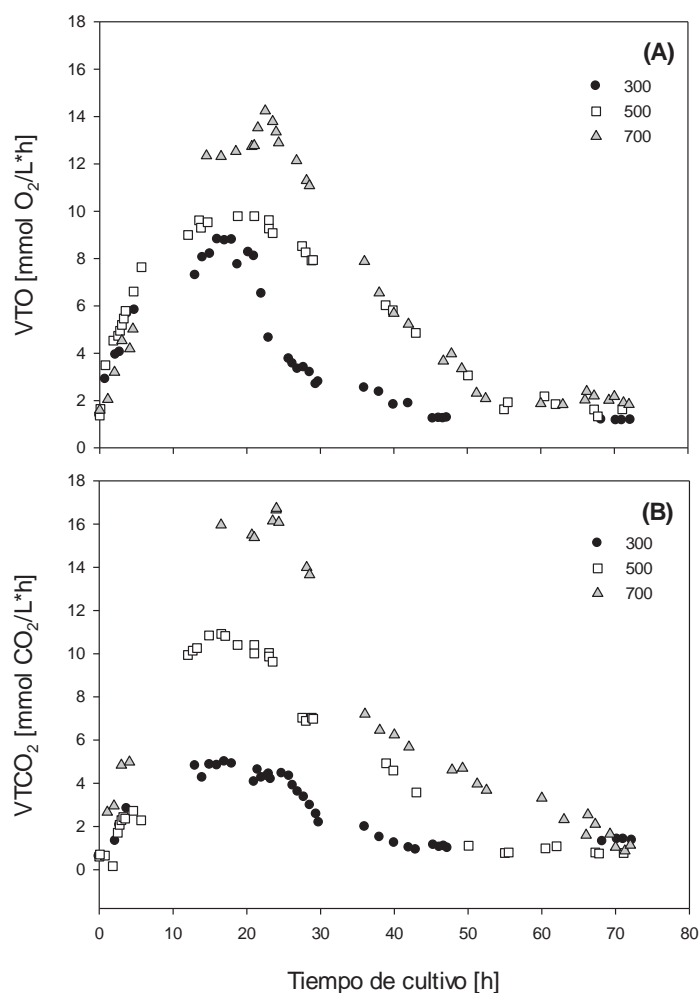


Figura 4.11: Velocidad de transferencia de oxígeno (A) y dióxido de carbono (B) en cultivos en biorreactor de *A. vinelandii* AT12, a 300, 500 y 700 [rpm], 30°C y 1vvm.

Como se observa en las Figuras 4.11 la velocidad de agitación no sólo afectó los niveles de VTO y $VTCO_2$ alcanzados, sino que también afectó su duración durante el cultivo. La duración de VTO en valores superiores a 2 [mmol $O_2/L \cdot h$] en cultivos desarrollados a 300, 500 y 700 [rpm] fue de aproximadamente 30, 50 y 51 horas respectivamente. En los cultivos a 300 y 700 [rpm] no se observó una duración prolongada de la $VTO_{m\acute{a}x}$. Mientras que para el cultivo llevado a cabo a 500 [rpm] la $VTO_{m\acute{a}x}$ se mantuvo durante 10 horas en la fase de crecimiento. La $VTO_{m\acute{a}x}$ corresponde al máximo valor de VTO constante en la fase de crecimiento, bajo limitación de oxígeno (TOD = 0).

A continuación en la Tabla 4.9 se presentan los valores máximos de VTO y $VTCO_2$, además de las velocidades específicas de consumo de oxígeno (q_{O_2}) y producción de dióxido de carbono (q_{CO_2}).

Tabla 4.9: Velocidad de transferencia de oxígeno y dióxido de carbono máxima para la cepa de *A. vinelandii* AT12, a diferentes velocidades de agitación.

Velocidad de agitación [rpm]	VTO máximo [mmol $O_2/L \cdot h$]	$VTCO_2$ máximo [mmol $CO_2/L \cdot h$]	q_{O_2} [mmol $O_2/g \cdot h$]	q_{CO_2} [mmol $CO_2/g \cdot h$]
300	8,78 (20 hrs.)	4,90 (18 hrs.)	8,9	5,0
500	9,79 (19 hrs.)	10,40 (19 hrs.)	8,8	9,4
700	14,24 (23 hrs.)	16,15 (24 hrs.)	8,4	9,1

El cociente respiratorio (RQ) es un parámetro muy útil para el análisis de la biosíntesis de alginato y PHB desde sacarosa (Sabra et al., 1999). En la Tabla 4.10 se presentan los valores de RQ promedios en fase de crecimiento de los cultivos de *A. vinelandii* AT12 a diferentes velocidades de agitación.

Tabla 4.10: Cociente respiratorio para la cepa de *A. vinelandii* AT12, a diferentes velocidades de agitación.

Velocidad de agitación [rpm]	Fase de cultivo	RQ promedio
300	Fase de crecimiento	0,77 ± 0,25
500	Fase de crecimiento	0,97 ± 0,12
700	Fase de crecimiento	1,16 ± 0,13

4.2.3. Balance de carbono a diferentes velocidades de agitación

Se realizaron balances de carbono para las distintas velocidades de agitación en fase de crecimiento y fase estacionaria. En la tabla 4.11 se muestra el porcentaje en que fue distribuido el carbono entregado por el sustrato (sacarosa) hacia biomasa, alginato, PHB y CO₂. El PHB se analizó aparte de la biomasa ya que su valor fue restado de esta.

Tabla 4.11: Balance de carbono para las diferentes velocidades de agitación

Velocidad de agitación [rpm]	Tiempo de cultivo [h]	Biomasa [%]	Alginato [%]	PHB [%]	CO ₂ [%]	Carbono total [%]
300	Fase de crecimiento	27,7%	29,8%	1,4%	28,1%	87,0%
500		23,3%	29,7%	2,2%	56,4%	111,6%
700		24,5%	23,5%	0,6%	36,5%	85,2%
300	Fase estacionaria	16,3%	20,5%	1,7%	24,9%	63,4%
500		21,7%	26,0%	0,8%	11,5%	60,0%
700		19,6%	22,8%	1,2%	12,1%	55,7%

De los resultados obtenidos desde el balance de carbono se puede apreciar que los cultivos realizados a 300 y 500 rpm obtiene un mayor porcentaje de carbono derivado a la producción de alginato en la fase de crecimiento (29,8% y 29,7%), pero en fase estacionaria es a 500 rpm que se obtiene un mayor porcentaje de carbono derivado a alginato (26,0%).

Para todas las condiciones de cultivo realizados se observa que desde que se alcanza el estado estacionario hasta el final del cultivo el flujo de carbono derivado a la producción de biomasa, alginato y CO₂ disminuyen.

Otro aspecto importante a destacar es que no todo el flujo de carbono se deriva a la producción de biomasa, alginato y CO₂, pudiéndose observar al no alcanzar el 100% del carbono total en la última columna de la Tabla 4.18, por lo que se supone que el flujo de carbono restante va en parte a los gasto energético por mantención y en gran medida a la producción de ácidos orgánicos.

4.3.COMPARACIÓN DE LAS CEPAS DE *AZOTOBACTER VINELANDII* ATCC 9046 y AT12 A 500 [RPM]

A modo de control y comparación se realizó un cultivo con la cepa ATCC 9046 a 500, ya que a esta condición con la cepa AT12 se obtuvo la mayor productividad específica de alginato ($0,054 \text{ [g}_{\text{alginato}}/\text{g}_{\text{biomasa}} \cdot \text{h}]$) y rendimiento de alginato por unidad de biomasa ($1,37 \pm 0,08 \text{ [g}_{\text{alginato}}/\text{g}_{\text{biomasa}}]$). Los resultados se presentan en la Figura 4.12.

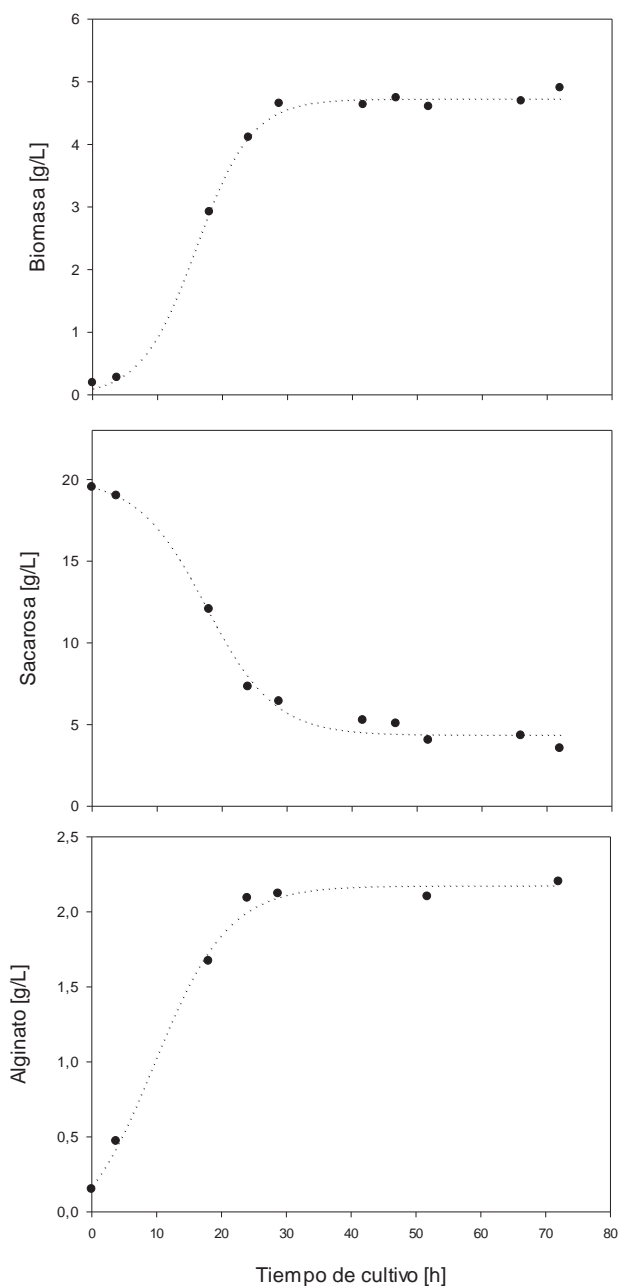


Figura 4.12: Cinética de crecimiento, consumo de sacarosa y producción de alginato en cultivos en biorreactor de *A. vinelandii* ATCC 9046 a 500 [rpm], 30°C y 1vvm.

La concentración celular máxima con la cepa ATCC 9046 a 500 [rpm] fue de 4,9 [g/L], alcanzando una producción de alginato de 2,2 [g/L] y un remanente de sacarosa de 3,5 [g/L] todas evidenciadas al final del cultivo.

Con los resultados obtenidos con ambas cepas de *A. vinelandii* a las mismas condiciones de cultivo se puede observar que con la cepa ATCC 9046 se obtiene una mayor concentración de biomasa máxima, alrededor de un 83,5% más en comparación con la cepa AT12. En cuanto a la producción máxima de alginato, esta se alcanza con la cepa modificada, en un 67,3% más en comparación con la cepa salvaje. Con respecto al consumo máximo de sacarosa, esta se obtuvo con la cepa salvaje en un 16,1±4,5% más que con la cepa modificada.

Se procedió a cuantificar el PHB (%p/p) y biomasa sin PHB en la cepa *A. vinelandii* ATCC 9046 a 500 [rpm] en la fase de crecimiento y estado estacionario, los cuales se presentan en la Tabla 4.12.

Tabla 4.12: PHB (%p/p) y biomasa sin PHB para la cepa *A. vinelandii* ATCC 9046 a 500 [rpm].

Fase de cultivo	PHB [%p/p]	Tiempo de Cultivo [h]	PHB [g/L]	Biomasa sin PHB [g/L]
Fase de crecimiento	36,19	24	1,49	2,62
Fase estacionaria	15,23	66	0,71	3,98

A continuación en las Tablas 4.13 y 4.14 se presentan los principales parámetros cinéticos asociados a la experiencia. Los resultados expuestos en la Tabla 4.14 fueron calculados en base a los ajustes de crecimiento, consumo y producción (ver Apéndice C.3).

Tabla 4.13: Parámetros cinéticos de las cepas *A. vinelandii* ATCC 9046 a 500 [rpm].

$Y_{X/S}$ [gbiomasa/gsustrato]	$Y_{Alg/S}$ [galginato/gsustrato]	$Y_{Alg/X}$ [galginato/gbiomasa]	$Y_{X/S}$ [gbiomasa sin PHB /gsustrato]	$Y_{Alg/X}$ [galginato/ gbiomasa sin PHB]
0,29	0,13	0,44	0,21	0,61

Tabla 4.14: Productividades y velocidad de consumo de sustrato de las cepas *A. vinelandii* ATCC 9046 y AT12, a 500 [rpm].

Q_{Alg} máximo [g _{alginato} /L*h]	q_{Alg} [g _{alginato} /g _{biomasa} *h]	Biomasa [g/L]	Alginato [g/L]	q_S máximo [g _{sustrato} /g _{biomasa} *h]
0,087 (18 hrs.)	0,029 (18 hrs.)	2,95 (18 hrs.)	1,74 (18 hrs.)	0,174 (18 hrs.)

En la Figura 4.13 se presentaran los resultados de la velocidad específica de crecimiento en el tiempo de la cepa *A. vinelandii* ATCC 9046, el cual fue calculado en base a los ajustes presentados en la Tabla C.7 (ver ajustes en Apéndice C.3).

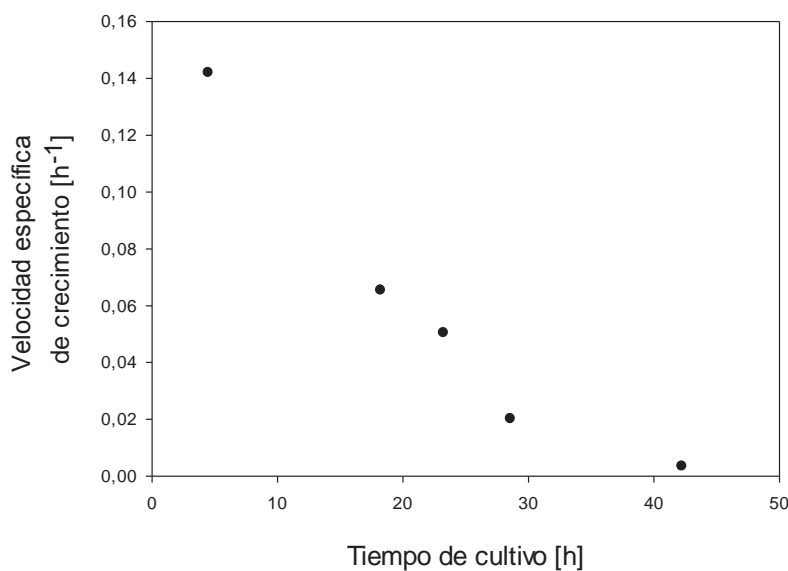


Figura 4.13: Velocidad específica de crecimiento en el tiempo de fase de crecimiento de la cepa *A. vinelandii* ATCC 9046 a 500 [rpm], 30°C y 1vvm.

A continuación en la Figura 4.14 se presenta los pesos moleculares promedios del alginato a diferentes puntos de las cinéticas para la cepa *A. vinelandii* ATCC 9046 a 500 [rpm], alcanzando un peso molecular promedio máximo de 359 [KDa].

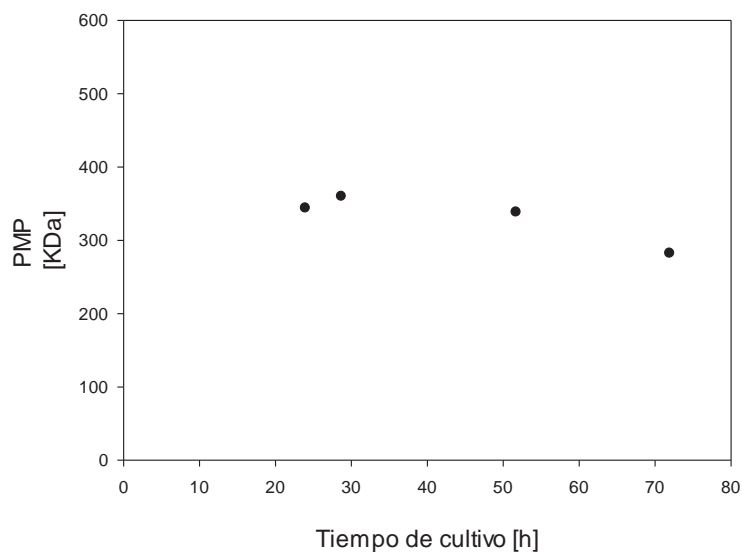


Figura 4.14: PMP del alginato durante el cultivo de *A. vinelandii* ATCC 9046 a 500 [rpm], 30°C y 1vvm.

A continuación en la Figura 4,15 se presenta el perfil de TOD, para cultivos de *A. vinelandii* ATCC 9046 a 500 [rpm].

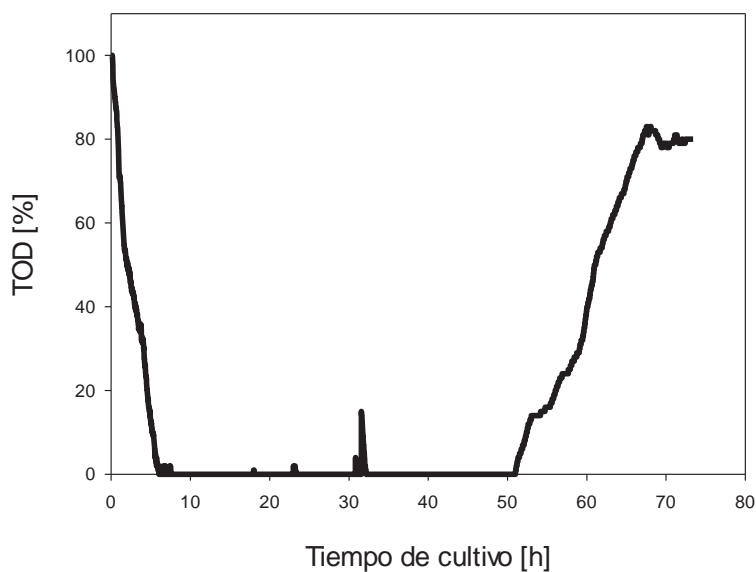


Figura 4.15: Perfil de TOD en cultivos de *A. vinelandii* ATCC 9046 a 500 [rpm], 30°C y 1vvm.

Se aprecia una gran diferencia en los perfiles de TOD entre la cepa salvaje y la cepa modificada a la misma velocidad de agitación, en cuanto al tiempo que demora cada cultivo hasta llegar a una TOD de cero y en la duración que esta se mantiene durante el cultivo.

Los cultivos realizados con la cepa ATCC9046 tienden a descender más rápidamente (6 hrs.) que en cultivos desarrollados con la cepa AT12 (13,5 hrs.). En cultivos desarrollados con la cepa ATCC 9046 el tiempo que se mantuvo la TOD en cero fue aproximadamente de 45 horas y para cultivos desarrollados con la cepa AT12 fue aproximadamente de 31 horas (Figura 4.10).

La subida de la TOD en el caso del cultivo con la cepa salvaje fue tardía, ya que se observó la subida alrededor de las 51 horas de cultivo y como se mostró en la Figura 4.12 el cultivo ya había llegado a estado estacionario.

Finalmente en la Tabla 4.15 se presenta un resumen comparativo entre ambas cepas de *A. vinelandii* en cuanto a los rendimientos, productividades y PMP máximo.

Tabla 4.15: Resumen comparativo entre las cepas de *A. vinelandii* ATCC 9046 y AT12 a 500 [rpm].

Cepa	$Y_{Alg/S}$ [galginato/gsacarosa]	$Y_{Alg/X}$ [galginato/gbiomasa]	Q_{Alg} máximo [galginato /L*h]	q_{Alg} [galginato/gbiomasa*h]	PMP máximo [KDa]
ATCC 9046	0,13	0,44	0,087 (18 hrs.)	0,029 (18 hrs.)	359
AT12	0,23 ± 0,02	1,37 ± 0,08	0,094 (28 hrs)	0,054 (28 hrs)	337

CAPÍTULO 5

5. DISCUSIONES

Dentro de la experiencia en matraces al analizar ambas cepas de *Azotobacter vinelandii*, si bien la cepa *A. vinelandii* ATCC 9046 presentó una concentración de biomasa total final mayor a la cepa *A. vinelandii* AT12, fue esta última la que presentó una mayor producción de alginato utilizando como fuente de carbono tanto sacarosa como glucosa (Figura 4.3).

Se realizó la cuantificación de PHB, otro de los productos generados por *Azotobacter vinelandii* además del Alginato, los resultados obtenidos demuestran que estamos en presencia de una cepa que posee efectivamente alterada la ruta de biosíntesis de PHB, ya que la concentración obtenida fue muy baja en comparación con lo que produce la cepa salvaje *A. vinelandii* ATCC 9046 a las mismas condiciones de cultivo ($1,25 \pm 0,03$ [g/L] con sacarosa y $1,07 \pm 0,15$ [g/L] con glucosa). En un reporte anterior se cuantificó el rendimiento de PHB con la cepa silvestre y cepa AT12, los cuales fueron $50,6 \pm 4,5$ [μg PHB/ mg proteína] e inferior a 1 [μg PHB/ mg proteína] respectivamente (Segura et al., 2003).

Los resultados alcanzados del trabajo en matraces con la cepa ATCC 9046 contrastan con lo reportado anteriormente, lo cual se podría atribuir a las diferencias en el medio de cultivo entre la utilizada en los estudios anteriores y la utilizada en el presente estudio. Los valores de q_{Alg} al utilizar glucosa como fuente de carbono se encuentran cercanos a $0,053 \pm 0,012$ [$\text{g}_{\text{alginato}}/\text{g}_{\text{biomasa}} \cdot \text{h}$] y $0,033 \pm 0,005$ [$\text{g}_{\text{alginato}}/\text{g}_{\text{biomasa}} \cdot \text{h}$] (Castillo et al., 2013; Clementi et al., 1999), los valores de $Y_{Alg/X}$ al utilizar sacarosa según se encuentran cercanos a $1,16 \pm 0,03$ [$\text{g}_{\text{alginato}}/\text{g}_{\text{biomasa}}$] (Peña et al., 2011), y con glucosa cercanos a $0,32 \pm 0,05$ [$\text{g}_{\text{alginato}}/\text{g}_{\text{biomasa}}$], $1,09 \pm 0,18$ [$\text{g}_{\text{alginato}}/\text{g}_{\text{biomasa sin PHB}}$], $0,47 \pm 0,12$ [$\text{g}_{\text{alginato}}/\text{g}_{\text{biomasa}}$] y $0,23 \pm 0,13$ [$\text{g}_{\text{alginato}}/\text{g}_{\text{biomasa}}$] (Castillo et al., 2013; Clementi et al., 1999). Finalmente los valores reportados de q_S al utilizar glucosa fueron de $0,124 \pm 0,013$ [$\text{g}_{\text{glucosa}}/\text{g}_{\text{biomasa}} \cdot \text{h}$] (Castillo et al., 2013).

Al comparar ambas cepas de *A. vinelandii* se observa que con la cepa AT12 se obtiene un $Y_{Alg/X}$ y un $Y_{Alg/S}$ de hasta 3,5 y 3 veces mayor respectivamente, con respecto a la cepa ATCC 9046 utilizando sacarosa como fuente de carbono. Estos resultados indican que la cepa modificada tiene un mayor potencial en cuanto a la producción de alginato que la cepa nativa, lo que abre una ventana importante para investigaciones posteriores. Estos resultados difirieron un tanto con respecto a

valores expuestos por estudios anteriormente presente en la Tabla 2.4. Esta diferencia se podría explicar por las diferentes condiciones del medio de cultivo (Segura et al., 2003).

El pH resultó ser uno de los factores que condicionó las cinéticas realizadas. En la Figura 4.7 se aprecia dicho comportamiento para los cultivos de *A. vinelandii* ATCC 9046 y AT12, llegando a valores de pH demasiado ácidos (5,0 - 5,4) para estos microorganismos. Si las células no poseen un ambiente adecuado para su crecimiento la producción de alginato se ve perjudicada.

Ahora con respecto al trabajo experimental en biorreactor con la cepa AT12 los resultados de esta investigación muestran que el cambio en la velocidad de agitación tiene diferentes efectos sobre q_{Alg} , q_S (Tabla 4.13), el peso molecular promedio (Figura 4.11 y Tabla 4.15), $VTO_{m\acute{a}x}$ (Tabla 4.16) y el $Y_{Alg/X}$ (Tabla 4.13)

Autores en trabajos anteriores indican que un aumento en la velocidad de agitación de 300 a 700 [rpm] influye en un aumento en q_S (Trabajos con control de TOD) (Peña et al., 2000). También se indica que a medida que aumenta la velocidad de agitación los valores de $VTO_{m\acute{a}x}$ (Díaz-Barrera et al., 2007). Estos comportamiento fueron observados durante trabajo realizado, en donde a medida que se aumentaba la velocidad de agitación aumentaba q_S y $VTO_{m\acute{a}x}$, alcanzando los máximos valores en los cultivos desarrollados a 700 [rpm], 0,354 [$g_{sacarosa}/g_{biomasa} \cdot h$] y 14,6 [mmol O₂/L*h].

De acuerdo a los perfiles de TOD, como ya se mencionó en el capítulo de resultados, la velocidad de agitación afecto el tiempo que demora la TOD en llegar cero y en la duración que este valor se mantiene durante el cultivo, corroborando así que se trabajó en una condición de limitación de oxígeno, también evidenciado en trabajos anteriores con la cepa ATCC 9046 (Díaz-Barrera et al., 2007).

Además se observa que a medida que aumenta la velocidad de agitación al peso molecular promedio (PMP) del alginato aumenta, alcanzando los más altos valores en los cultivos a 500 y 700 [rpm] (Tabla 4.9). Los resultados obtenidos contrastan con estudios realizados con la cepa salvaje ATCC 9046 en condición de no fijación de nitrógeno (Peña et al., 2000; Díaz-Barrera et al., 2007; Lozano et al., 2011) en donde se observó que el PMP del alginato aumentó a medida que disminuyó la velocidad de transferencia de oxígeno máxima ($VTO_{m\acute{a}x}$).

Como se observó que la mejor condición de cultivo en biorreactor fue a 500 [rpm] se procedió a realizar el control con la cepa ATCC 9046, para la cual el valor máximo de q_{Alg} fue de 0,029 [g_{alginato}/g_{biomasa}*h] obtenido a las 18 horas de cultivo, el $Y_{Alg/X}$ fue de 0,44 [g_{alginato}/g_{biomasa}] y 0,61 [g_{alginato}/g_{biomasa sin PHB}] y la q_S máxima fue de 0,174 [g_{sacarosa}/g_{biomasa}*h]. Estos valores obtenidos en comparación con la cepa AT12 son respectivamente bajos, lo que da cuenta del real potencial de esta modificada sobre la producción de alginato.

Al comparar los cultivos con ambas cepas de *A. vinelandii* a 500 [rpm] se observa claramente la diferencia de la velocidad específica de crecimiento (μ), obteniendo mayores valores a tiempos cortos de cultivo de la cepa salvaje en comparación con la cepa modificada (Figura 4.16), observando el mismo comportamiento en reportes anteriores en donde se trabajó con la cepa modificada SML2 (Trujillo-Roldán et al., 2003). Además si comparamos los rendimientos, se observa que con la cepa AT12 se alcanza un $Y_{Alg/S}$ y un $Y_{Alg/X}$ hasta 2 y 3 veces más alto respectivamente en comparación a la cepa ATCC 9046, lo cual nos muestra que la cepa AT12 es más productiva que la cepa ATCC 9046.

Se obtienen valores similares de q_{Alg} y $Y_{Alg/X}$ a nivel de matraces utilizando sacarosa como fuente de carbono y a nivel de biorreactor a 500 [rpm], pero si se comparan los valores de PMP obtenidos a nivel de matraces y biorreactor, los obtenidos en este último son 1,14 veces menor a los valores obtenidos en matraces (Tabla 4.4). Esto concuerda con lo reportado en trabajos anteriores, en donde se observó el mismo comportamiento, se expone que esta caída del peso molecular se podría deber a la diferencia de potencia absorbida por los matraces y biorreactor (Reyes, C., C. Peña y E. Galindo, 2003).

Se ha reportado que valores inferiores de RQ (0,8 [mmol CO₂/mmol O₂]) se asocia con una mayor conversión de la fuente de carbono como glucosa, fructosa o sacarosa para la producción de alginato, del mismo modo valores altos de RQ (1,33 [mmol CO₂/mmol O₂]) el flujo de carbono es derivado a la formación de PHB (Sabra et al., 1999). También se ha reportado que en experiencias en donde se trabajó con matraces agitados a 200 y 100 [rpm], se obtuvo un RQ de 0,95 y 1,21 [mmol CO₂/mmol O₂] respectivamente, teniendo una mayor producción de alginato a RQ bajos (Peña et al., 2011). Los resultados obtenidos en la experiencia en el biorreactor no concuerdan con lo reportado por Peña, ya que se observó que a medida que aumentaba la velocidad de agitación aumentaba el RQ. En el cultivo a 500 [rpm], el cual se obtuvo una mayor q_{Alg} (0,054 [g_{alginato}/g_{biomasa}*h]) también se observó un RQ bajo (0,97 ± 0,12 [mmol CO₂/mmol O₂]) y un 26% del carbono fue derivado a la producción de

alginato (porcentaje más alto entre las tres condiciones de trabajo), lo cual concuerda por lo reportado por Sabra.

De las experiencias realizadas tanto en matraces como en biorreactor con ambas cepas de *A. vinelandii* se apreció la producción de alginato estuvo asociado al crecimiento. Esta característica se ha evidenciado anteriormente trabajando con cepas de *A. vinelandii* salvajes y mutadas, tanto en matraces como en biorreactor (Peña et al., 2011; Trujillo-Roldán et al., 2003). También se ha evidenciado que el alginato puede estar no asociado a crecimiento (Peña et al., 2007; Reyes et al., 2003).

Las velocidades específicas de crecimiento (μ) como se aprecia en las Figuras 4.3, 4.8 y 4.13 no son constantes durante todo el cultivo y en el caso de la cepa AT12 se vio afectada tanto por la fuente de carbono como por la velocidad de agitación.

Se observa una gran diferencia de consumo de la fuente de carbono entre la experiencia en matraces y biorreactor. Por otro lado, según la concentración de sacarosa en la alimentación medida, que resultó estar alrededor de los 20 [g/L] para todos los casos estudiados, se puede deducir a partir de las Figuras 4.3, 4.8 y 4.15 siempre quedo un remanente de sacarosa. Esto último sugiere que los cultivos no estaban limitados por la fuente de carbono, comportamiento que ocurre generalmente en cultivos por lotes sin control de la TOD (Díaz-Barrera et al., 2007; Reyes et al., 2003; Peña et al., 1997).

CAPÍTULO 6

6. CONCLUSIONES

A partir de los resultados y discusiones realizadas, se puede concluir lo siguiente.

De los cultivos realizados a nivel de matraces y biorreactor se observa el gran potencial de la cepa modificada *A. vinelandii* AT12 sobre la producción de alginato.

La cepa *A. vinelandii* AT12 tanto con sacarosa como con glucosa alcanzó una mayor productividad específica del alginato (q_{Alg}) y rendimiento de alginato por unidad de biomasa ($Y_{Alg/X}$) con respecto a la cepa *A. vinelandii* ATCC 9046, pero es con sacarosa a la cual se obtuvo las más altas productividades y rendimientos específicos (138,1% y 26,4% más que con glucosa).

No se aprecia un claro efecto de la velocidad de agitación sobre el rendimiento de alginato por unidad de biomasa ($Y_{Alg/X}$), pero sí sobre la productividad específica del alginato (q_{Alg}). Estos parámetros alcanzaron sus mayores valores cuando se realizan cultivos a 500 [rpm], en donde se obtienen valores de cociente respiratorio (RQ) más bajos.

Además, la velocidad de agitación tiene diferentes efectos sobre el peso molecular promedio del alginato (PMP) y la velocidad de transferencia de oxígeno máxima ($VTO_{máx}$). Estos parámetros alcanzan sus mayores valores a medida que aumenta la velocidad de agitación.

CAPÍTULO 7

7. RECOMENDACIONES

En este trabajo solo se cuantifico dos biopolímeros (alginato y PHB) que se generan en los cultivos de *Azotobacter vinelandii*. Como se observó una rápida caída del pH en las fermentaciones en matraces de la cepa AT12 y una desviación del flujo de carbono a un polímero extra en las fermentaciones en biorreactor, sería interesante incluir un análisis de ácidos orgánicos en ambas experiencias.

Así mismo por los problemas de la caída del pH en los cultivos, se podría trabajar con una solución amortiguadora (MOPS), en una concentración que no afecte las condiciones de cultivo, para mantener durante más tiempo el pH cercano a 7,2, ya que se ha demostrado al utilizar esta solución mejores productividades.

Por otro lado se podría trabajar a las mismas velocidades de agitación, ahora en cultivos con control de la tensión oxígeno disuelto (a diferentes TOD) en condición de limitación de oxígeno.

Finalmente como se comprobó en el presente estudio que la cepa AT12 es más productiva que la cepa ATCC 9046 y a la vez no ha sido tan estudiada, sería interesante realizar cultivos continuos con la cepa AT12 a diferentes velocidades específicas de crecimiento (D), en donde se podría evaluar el efecto de velocidad de agitación en cultivos sin o con control de la TOD.

CAPÍTULO 8

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acevedo, F., J. C. Gentina y A. Illanes. (2002). Capítulo 4: Cinética de fermentaciones. En Acevedo, Fundamentos de Ingeniería Bioquímica (pp.91- 123). Santiago de Chile: Ediciones Universitarias de Valparaíso. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.
- Anderson, A.J., A.J. Hacking y E.A. Dawes. (1987). Alternative Pathways for the Biosynthesis of Alginate from Fructose and Glucose in *Pseudomonas mendocina* and *Azotobacter vinelandii*. *Journal of General Microbiology* 133: 1045-1052.
- Bixler, H.J. y H. Porse. (2011). A decade of change in the seaweed hydrocolloids industry. *Journal Appl Phycol.* 23(3): 321-335.
- Castillo, T., E. Heinzle, S. Peifer, K. Schneider y C. Peña. (2013). Oxygen supply strongly influences metabolic fluxes, the production of poly(3-hydroxybutyrate) and alginate, and the degree of acetylation of alginate in *Azotobacter vinelandii*. *Process Biochemistry.* 48(7): 995-1003.
- Clementi, F., M.A. Crudele, E. Parente, M. Mancini y M. Moresi. (1999). Production and characterisation of alginate from *Azotobacter vinelandii*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79: 602 – 610.
- Clementi, F., P. Fantozzi, F. Mancini y M. Moresi. (1995). Optimal conditions for alginate production by *Azotobacter vinelandii*. *Enzyme and Microbial Technology* 17: 983 - 988.
- Díaz-Barrera, A., C. Peña y E. Galindo. (2007). The oxygen transfer rate influences the molecular mass of the alginate produced by *Azotobacter vinelandii*. *Appl Microbiol Biotechnol* 76:903-910.
- Díaz-Barrera, A. y E. Soto. (2010). Biotechnological uses of *Azotobacter vinelandii*: Current state, limits and prospects. *African Journal of Biotechnology.* 9(33): 5240-5250.
- Espín, G. (2002). Biología de *Azotobacter vinelandii*. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap6/capitulo.html>. Extraído el 9 de Abril de 2013 desde <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap6/capitulo.html>.

- Franklin, MJ y Ohman DE. (1993). Identification of AlgF in the alginate biosynthetic gene cluster of *Pseudomonas aeruginosa* which is required for alginate acetylation. *Journal Bacteriol.* 175: 5057-5065.
- Galindo, E., C. Peña, C. Núñez, D. Segura y G. Espín. (2007). Molecular and bioengineering strategies to improve alginate and polyhydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii*. *Microbial Cell Factories.* 6(7).
- García-Garibay, Quintero-Ramírez y López-Munguía. (2004). Capítulo 13: Biopolímeros. En López-Munguía, *Biotecnología Alimentaria* (pp. 423-451). México: Editorial Limusa.
- Gimmestad, M., H. Ertesvag, T. M. Bjerkan, O. Aarstad, B. I. Glærum y S. Valla. (2009). Characterization of Three New *Azotobacter vinelandii* Alginate Lyases, One of Which Is Involved in Cyst Germination. *Journal of Bacteriology.* 191(15): 4845-4853
- Hay, I.D., Z. Rehman, A. Ghafoor y B. Rehm. (2010). Bacterial biosynthesis of alginates. *Journal Chem Technol Biotechnol.* 85: 752-759.
- Hay, I.D., Z. Rehman, M. F. Moradali, Y. Wang y B. Rehm. (2013). Microbial alginate production, modification and its applications. *Microbial Biotechnology.* 6(6): 637-650.
- Horan, N.J., T.R. Jarman y E.A. Dawes. (1981). Effects of Carbon Source and Inorganic Phosphate Concentration on the Production of Alginic Acid by a Mutant of *Azotobacter vinelandii* and on the Enzymes Involved in its Biosynthesis. *Journal of General Microbiology* 127: 185-191.
- Kayser, A., J. Weber, V. Hecht y U. Rinas. (2005). Metabolic flux analysis of *Escherichia coli* in glucose-limited continuous culture. I. Growth-rate dependent metabolic efficiency at steady state. *Microbiology.* 151: 693-706.
- Lee, K. y D. J. Mooney. (2012). Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science.* 37: 106–126.
- Lozano, E., E. Galindo, C. Peña. (2011). Oxygen transfer rate during the production of alginate by *Azotobacter vinelandii* under oxygen limited and non oxygen-limited conditions. *Microbial cell factories.* 10:13.

- Mejía, M.A., D. Segura, G Espín, E. Galindo, C. Peña (2010). Two-stage fermentation process for alginate production by *Azotobacter vinelandii* mutant altered in poly-b-hydroxybutyrate (PHB) synthesis. *Journal Appl Microbiol.* 108(1):55-61
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry.* 31(3): 426-428.
- Moshiri, F., B. R. Crouse, M. K. Johnson y M. J. Maier. (1995). The "nitrogenase protective" FeSII protein of *Azotobacter vinelandii*: overexpression, characterization and crystallization. *Biochem.* 34: 12973-12982.
- Nosrati, R., P. Owlia, H. Saderi, M. Olamaee, I. Rasooli y T.A. Akhavian. (2012). Correlation between nitrogen fixation rate and alginate productivity of an indigenous *Azotobacter vinelandii* from Iran. *Iranian Journal of Microbiology.* 4(3): 153-159.
- Peña, C., N. Campos y E. Galindo. (1997). Changes in alginate molecular mass distributions, broth viscosity and morphology of *Azotobacter vinelandii* cultured in shake flasks. *Appl Microbial Biotechnol.* 48: 510-515.
- Peña, C., E. Galindo y J. Büchs. (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 Biochemistry* 46: 290-297.
- Peña, C, L. Miranda, D. Segura, C. Nuñez, G. Espín y E. Galindo. (2002). Alginate production by *Azotobacter vinelandii* mutants altered in poly-B- hydroxybutyrate and alginate biosynthesis. *Industrial Microbiology & Biotechnology.* 29: 209-213.
- Peña, C, M. A. Trujillo-Roldán, E. Galindo. (2000). Influence of dissolved oxygen tension and agitation speed on alginate production and its molecular weight in cultures of *Azotobacter vinelandii*. *Enzyme Microb Technol.* 27: 390-398.
- Reyes, C., C. Peña y E. Galindo. (2003). Reproducing shake flasks performance in stirred fermentors: production of alginates by *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Biotechnology* 105: 189-198.

- Rehm, B.H.A., H. Ertesvag y S. Valla. (1996). A new *A. vinelandii* mannuronan C-5 epimerase gene (algG) is part of an alg gene cluster physically organized in a manner similar to that in *P. aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*. 178: 5884-5889.
- Rehm, B.H. y S. Valla. (1997). Bacterial alginates: biosynthesis and applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 48: 281-288.
- Remminghorst, U. y B.H.A. Rehm. (2006a). Alg 44, a unique protein required for alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. 580: 3883-3888.
- Remminghorst, U. y B.H.A. Rehm. (2006b). Bacterial alginates: from biosynthesis to applications. *Biotechnol Lett*. 28: 1701-1712.
- Sadoff, H. (1975). Encystment and germination in *Azotobacter vinelandii*. *Bacteriol. Rev*. 39: 516-539.
- Sabra, W., A.P. Zeng, S. Sabry, S. Omar y W.D. Deckwer. (1999). Effect of phosphate and oxygen concentrations on alginate production and stoichiometry of metabolism of *Azotobacter vinelandii* under microaerobic conditions. *Appl Microbiol Biotechnol* 52: 773-780.
- Sabra, W., A. Zeng y W. Deckwer. (2001). Bacterial alginate: physiology, product quality and process aspects. *Appl Microbiol Biotechnol*. 56(3-4): 315-325.
- Segura, D., T. Cruz y G. Espín. (2003). Encystment and alkylresorcinol production by *Azotobacter vinelandii* strains impaired in poly-hydroxybutyrate synthesis. *Arch Microbiol*. 179: 437-443
- Sutherland, I. (1990). *Biotechnology of microbial exopolysaccharides*. Cambridge University Press. Cambridge New York. 7: 1-20.
- Thorneley, R. N. y G. A. Ashby. (1989). Oxydation of nitrogenase iron protein by dioxygen without inactivation could contribute to high respiration rates in *Azotobacter* species and facilitate nitrogen fixation in other aerobic environments. *Journal Biochem*. 261: 181-187.
- Trujillo-Roldán, M. A., S. Moreno, D. Segura, E. Galindo, G. Espín. (2003). Alginate production by an *Azotobacter vinelandii* mutant unable to produce alginate lyase. *Appl Microbiol Biotechnol*. 60: 733-737.

Trujillo-Roldán, M. A., S. Moreno, G. Espín, E. Galindo. (2004). The roles of oxygen and alginate-lyase in determining the molecular weight of alginate produced by *Azotobacter vinelandii*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 63:742–747.

Urzúa, L. S. y Baca, B. E. (2001). Mecanismos de protección de la nitrogenasa a la inactivación por oxígeno. *Rev Latinoam Microbiol.* 43: 37-49.

APÉNDICE

APÉNDICE A: PROTOCOLO MÉTODOS ANALÍTICOS

APÉNDICE A.1: Determinación del crecimiento microbiano por espectrofotometría y peso seco

Preparación de materiales

- Confeccionar capachos de papel aluminio
- Secar en la estufa a 105°C hasta que el peso sea constante
- Colocar en desecadora hasta que alcance temperatura ambiente y obtener nuevamente un peso constante.

Curva de calibrado Biomasa

- La curva de calibrado de biomasa se construye de la siguiente manera:
- Se realiza un cultivo de *A. vinelandii* en matraces Erlenmeyer de 250 [mL] a 200 [rpm] y 30°C asegurando obtener células en etapa de crecimiento (aprox. 16-20 h).
- Se toman 20 [mL] del caldo de cultivo (por duplicado) y se le adicionan 2 [mL] de EDTA 0,1 M y 2 [mL] de NaCl 1 M.
- Se centrifuga a 10000 [rpm] por 10 minutos (repitiéndose 3 veces).
- El pellet obtenido luego de los 2 lavados se deposita en capachos de aluminio previamente secados a 80°C hasta peso constante y pesado.
- Por diferencia del peso del capacho antes de colocar la muestra y luego de seca la muestra a 80°C hasta peso constante, y considerando el volumen de 20 [mL], se obtiene la concentración celular.
- Paralelamente se toman 10 [mL] del caldo de cultivo del matraz y se realizan diluciones entre 8 y 70 veces, asegurándose que la absorbancia esté entre 0,1 y 0,8.

Tubo	Dilución	Volumen de Caldo (mL)	Volumen de agua destilada (mL)	Abs 1	Abs 2	Concentración Biomasa (g/L)
Blanco	1	0	5			
1	70	0,1	6,9			
2	60	0,1	5,9			
3	50	0,1	4,9			
4	45	0,1	4,4			
5	40	0,1	3,9			
6	35	0,1	3,4			
7	30	0,1	2,9			
8	25	0,1	2,4			
9	20	0,2	3,8			
10	15	0,2	2,8			
11	10	0,2	1,8			
12	8	0,4	2,8			

- Se mide absorbancia de estas diluciones a 540 [nm] usando como blanco agua destilada.

APÉNDICE A.2: Determinación de la concentración de sacarosa por Invertasa-DNS y glucosa por DNS

Preparación reactivo DNS

- La solución de DNS se prepara pesando 1,6 g de hidróxido de sodio (marca Merck), 30 g de tartrato de sodio (marca Merck) y 1 g de reactivo DNS (marca Merck) de la siguiente manera.
- En un vaso precipitado de 200 [mL] se adicionan 50 [mL] de agua destilada en donde se disuelve el hidróxido de sodio y el tartrato de sodio.
- La solución se calienta con agitación en una manta calefactora (marca LabTech modelo LMS-1003) a 70°C y se le agrega lentamente el reactivo DNS, una vez disuelto se pone a temperatura ambiente y se deja enfriar.
- La solución se afora a 100 [mL] y con agua destilada.
- Se almacena el reactivo DNS protegido de la luz en una botella ámbar envuelto en papel aluminio a temperatura ambiente.

Preparación de la solución enzimática estándar

- Pesar 2,5 mg de enzima invertasa β -Fructofuranosidasa (marca Sigma).
- Pesar 0,197 g de ácido cítrico (marca Loba Chemie).
- Pesar 9,1 g de citrato de sodio (marca Loba Chemie).
- Disolver el ácido cítrico en 50 [mL] de agua destilada.
- Disolver el citrato de sodio en 50 [mL] de agua destilada.

- Adicionar gota a gota la solución de citrato en la solución de ácido cítrico hasta ajustar el pH a 4,6.
- Disolver la enzima invertasa en 1 [mL] de tampón citrato.

Curva de calibrado Sacarosa

- Se preparan 100 [mL] de solución aforada estándar de sacarosa de 2 [g/L] con agua destilada.
- De la solución estándar se prepara una batería de tubos con concentraciones que varían entre 0,2 y 2 [g/L].

Tubo	[Sacarosa] (g/L)	Volumen de solución Sacarosa (mL)	Volumen de agua destilada (mL)	Abs 1	Abs 2	Promedio Abs	Desviación estandar
Blanco	0,0	0,0	1,0				
1	0,2	0,1	0,9				
2	0,4	0,2	0,8				
3	0,6	0,3	0,7				
4	0,8	0,4	0,6				
5	1,0	0,5	0,5				
6	1,2	0,6	0,4				
7	1,4	0,7	0,3				
8	1,6	0,8	0,2				
9	1,8	0,9	0,1				
10	2,0	1,0	0,0				

- Se toman 0,9 [mL] de cada dilución anterior y se mezcla con 0,1 [mL] de la solución enzimática, dejando reaccionar durante 5 minutos.
- Luego se le agrega 1 [mL] de DNS, posteriormente se tapan los tubos y disponen en un baño a ebullición por 10 minutos.
- Se retiran los tubos del baño a ebullición y se colocan en un baño de hielo.
- Luego se agregan 10 [mL] de agua destilada a cada tubo.
- Se mide absorbancia de cada tubo a 540 [nm], utilizando como blanco la solución con agua destilada.

Curva de calibrado Glucosa

- Se preparan 100 [mL] de solución aforada estándar de glucosa de 2 [g/L] con agua destilada.
- De la solución estándar se prepara una batería de tubos con concentraciones que varían entre 0,2 y 2 [g/L].

Tubo	[Glucosa] (g/L)	Volumen de solución Glucosa (mL)	Volumen de agua destilada (mL)	Abs 1	Abs 2	Promedio Abs	Desviación estandar
Blanco	0,0	0,0	1,0				
1	0,2	0,1	0,9				
2	0,4	0,2	0,8				
3	0,6	0,3	0,7				
4	0,8	0,4	0,6				
5	1,0	0,5	0,5				
6	1,2	0,6	0,4				
7	1,4	0,7	0,3				
8	1,6	0,8	0,2				
9	1,8	0,9	0,1				
10	2,0	1,0	0,0				

- Se toma 1 [mL] de cada dilución y se le agrega 1 [mL] de DNS, posteriormente se tapan los tubos y disponen en un baño a ebullición por 10 minutos.
- Se retiran los tubos del baño a ebullición y se colocan en un baño de hielo.
- Luego se agregan 10 [mL] de agua destilada a cada tubo.
- Se mide absorbancia de cada tubo a 540 [nm], utilizando como blanco la solución con agua destilada.

APÉNDICE B: CURVAS DE CALIBRADO

APÉNDICE B.1: Curva de calibrado Biomasa

A continuación se muestran las curvas de calibrado de biomasa para las cepas *Azotobacter vinelandii* ATCC 9046 y AT12 al utilizar sacarosa como fuente de carbono.

Cepa salvaje de *A. vinelandii* ATCC 9046

Tabla B.1: Datos brutos para el cálculo de la concentración de biomasa ATCC 9046.

Capachos	Peso capacho [g]	Peso capacho + biomasa [g]	Biomasa [g]	Muestra [mL]	Concentración de biomasa [g/L]	Concentración de biomasa promedio [g/L]	Desviación estándar [g/L]
1	0,907	0,929	0,022	10	2,19	2,06	0,19
2	0,902	0,920	0,019	10	1,85		
3	0,782	0,803	0,022	10	2,15		
4	1,148	1,167	0,019	10	1,92	1,97	0,05
5	1,286	1,306	0,020	10	2,02		
6	1,242	1,262	0,020	10	1,98		

Tabla B.2: Datos brutos para obtención de la curva de calibrado de biomasa ATCC 9046.

Tubo	Dilución	Volumen de Caldo (mL)	Volumen de agua destilada (mL)	Abs 1	Abs 2	Concentración Biomasa 1 (g/L)	Concentración Biomasa 2 (g/L)	Abs promedio	Concentración Biomasa promedio (g/L)	Desviación estándar (g/L)
Blanco	0	0	5	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
1	70	0,1	6,9	0,099	0,094	0,029	0,028	0,097	0,029	0,001
2	60	0,1	5,9	0,129	0,133	0,034	0,033	0,131	0,034	0,001
3	50	0,1	4,9	0,148	0,151	0,041	0,039	0,150	0,040	0,001
4	45	0,1	4,4	0,179	0,181	0,046	0,044	0,180	0,045	0,001
5	40	0,1	3,9	0,175	0,183	0,052	0,049	0,179	0,050	0,002
6	35	0,1	3,4	0,191	0,215	0,059	0,056	0,203	0,058	0,002
7	30	0,1	2,9	0,238	0,240	0,069	0,066	0,239	0,067	0,002
8	25	0,1	2,4	0,285	0,273	0,083	0,079	0,279	0,081	0,003
9	20	0,2	3,8	0,348	0,350	0,103	0,099	0,349	0,101	0,003
10	15	0,2	2,8	0,447	0,447	0,138	0,132	0,447	0,135	0,004
11	10	0,2	1,8	0,653	0,661	0,206	0,197	0,657	0,202	0,006
12	8	0,4	2,8	0,770	0,794	0,258	0,247	0,782	0,252	0,008
13	6	0,4	2	0,952	0,976	0,344	0,329	0,964	0,336	0,011

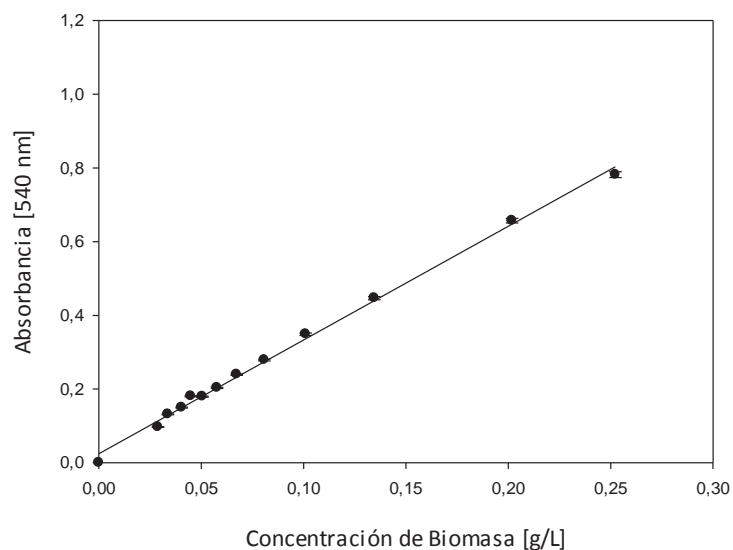


Figura B.1: Curva de calibrado para la determinación de biomasa por espectrofotometría para *A. vinelandii* ATCC 9046 utilizando sacarosa como fuente de carbono.

Desde la regresión lineal se obtuvo la siguiente ecuación y su respectivo coeficiente de correlación al eliminar el último punto.

$$\text{Absorbancia} = 3,0899 * [\text{Biomasa}] + 0,0241$$

$$R^2 = 0,9967$$

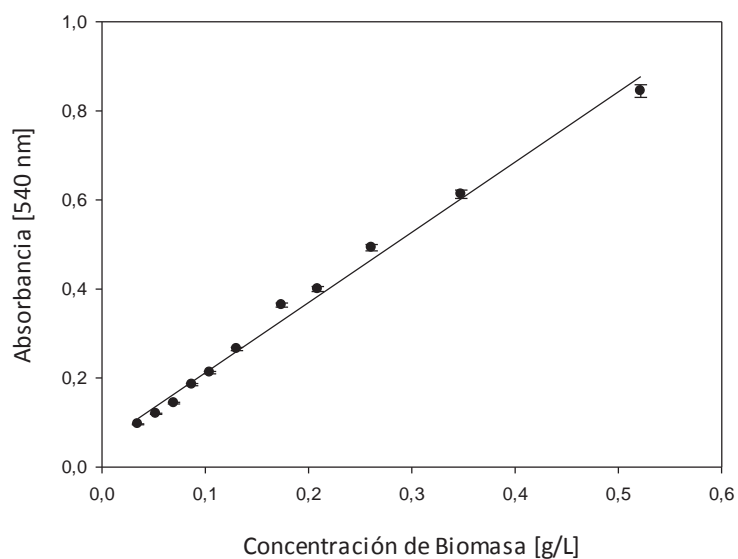
Cepa modificada de *A. vinelandii* AT12

Tabla B.3: Datos brutos para el cálculo de la concentración de biomasa AT12.

Capachos	Peso capacho [g]	Peso capacho + biomasa [g]	Biomasa [g]	Muestra [mL]	Concentración de biomasa [g/L]	Concentración de biomasa promedio [g/L]	Desviación estandar [g/L]
1	0,411	0,421	0,010	10	0,960	1,023	0,22
2	0,421	0,430	0,008	10	0,840		
3	0,400	0,413	0,013	10	1,270	1,063	0,20
4	0,424	0,433	0,009	10	0,860		
5	0,413	0,425	0,013	10	1,250		
6	0,400	0,411	0,011	10	1,080		

Tabla B.4: Datos brutos para obtención de la curva de calibrado de biomasa AT12.

Tubo	Dilución	Volumen de Caldo (mL)	Volumen de agua destilada (mL)	Abs 1	Abs 2	Concentración Biomasa 1 (g/L)	Concentración Biomasa 2 (g/L)	Abs promedio	Concentración Biomasa promedio (g/L)	Desviación estándar (g/L)
Blanco	0	0	5	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
1	30	0,1	2,9	0,095	0,097	0,034	0,035	0,096	0,035	0,001
2	20	0,1	1,9	0,118	0,121	0,051	0,053	0,120	0,052	0,001
3	15	0,2	2,8	0,153	0,134	0,068	0,071	0,144	0,070	0,002
4	12	0,2	2,2	0,186	0,184	0,085	0,089	0,185	0,087	0,002
5	10	0,2	1,8	0,205	0,219	0,102	0,106	0,212	0,104	0,003
6	8	0,4	2,8	0,259	0,271	0,128	0,133	0,265	0,130	0,004
7	6	0,4	2	0,354	0,374	0,171	0,177	0,364	0,174	0,005
8	5	0,4	1,6	0,390	0,410	0,205	0,213	0,400	0,209	0,006
9	4	0,8	2,4	0,495	0,491	0,256	0,266	0,493	0,261	0,007
10	3	0,8	1,6	0,605	0,621	0,341	0,354	0,613	0,348	0,009
11	2	1	1	0,840	0,849	0,512	0,532	0,845	0,522	0,014

Figura B.2: Curva de calibrado para la determinación de biomasa por espectrofotometría para *A. vinelandii* AT12 utilizando sacarosa como fuente de carbono.

Desde la regresión lineal se obtuvo la siguiente ecuación y su respectivo coeficiente de correlación.

$$\text{Absorbancia} = 1,5785 * [\text{Biomasa}] + 0,0539$$

$$R^2 = 0,9919$$

APÉNDICE B.2: Curva de calibrado Sacarosa

A continuación se muestra la curva de calibrado para sacarosa o glucosa respectivamente.

Tabla B.5: Datos brutos para obtención de la curva de calibrado de sacarosa.

Tubo	[Sacarosa] (g/L)	Volumen de solución Sacarosa (mL)	Volumen de agua destilada (mL)	Abs 1	Abs 2	Promedio Abs	Desviación estándar (g/L)	Desviación estándar promedio (g/L)
Blanco	0,0	0,0	1,0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,012
1	0,2	0,1	0,9	0,110	0,102	0,106	0,006	
2	0,4	0,2	0,8	0,189	0,156	0,173	0,023	
3	0,6	0,3	0,7	0,283	0,241	0,262	0,030	
4	0,8	0,4	0,6	0,381	0,366	0,374	0,011	
5	1,0	0,5	0,5	0,477	0,492	0,485	0,011	
6	1,2	0,6	0,4	0,540	0,555	0,548	0,011	
7	1,4	0,7	0,3	0,633	0,638	0,636	0,004	
8	1,6	0,8	0,2	0,803	0,815	0,809	0,008	
9	1,8	0,9	0,1	0,887	0,720	0,804	0,118	
10	2,0	1,0	0,0	0,984	0,973	0,979	0,008	

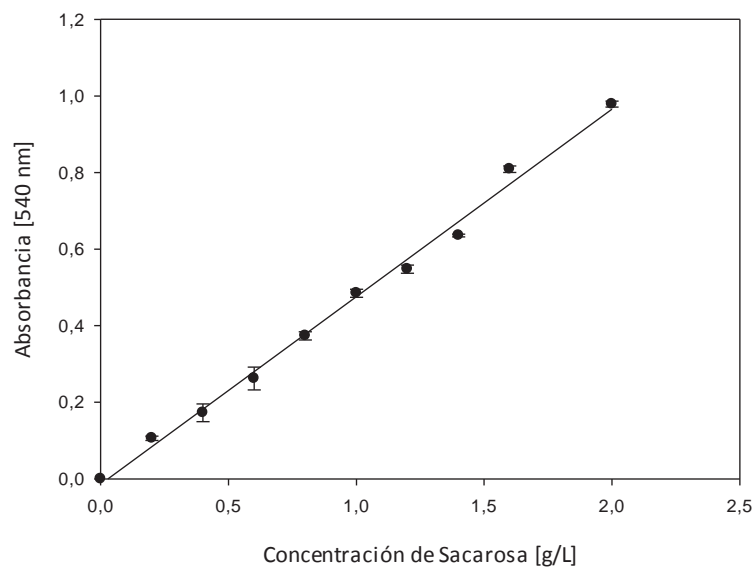


Figura B.3: Curva de calibrado sacarosa.

Desde la regresión lineal se obtuvo la siguiente ecuación y su respectivo coeficiente de correlación al eliminar el punto nº 9 de los datos de absorbancia 2.

$$\text{Absorbancia} = 0,493 * [\text{Sacarosa}] - 0,0152$$

$$R^2 = 0,9952$$

APÉNDICE B.3: Curva de calibrado Glucosa

Tabla B.6: Datos brutos para obtención de la curva de calibrado de glucosa.

Tubo	[Glucosa] (g/L)	Volumen de solución Glucosa (mL)	Volumen de agua destilada (mL)	Abs 1	Abs 2	Promedio Abs	Desviación estándar (g/L)	Desviación estándar promedio (g/L)
Blanco	0,0	0,0	1,0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,019
1	0,2	0,1	0,9	0,084	0,084	0,084	0,000	
2	0,4	0,2	0,8	0,156	0,155	0,156	0,001	
3	0,6	0,3	0,7	0,283	0,249	0,266	0,024	
4	0,8	0,4	0,6	0,374	0,281	0,328	0,066	
5	1,0	0,5	0,5	0,465	0,466	0,466	0,001	
6	1,2	0,6	0,4	0,363	0,494	0,429	0,093	
7	1,4	0,7	0,3	0,618	0,645	0,632	0,019	
8	1,6	0,8	0,2	0,744	0,744	0,744	0,000	
9	1,8	0,9	0,1	0,848	0,838	0,843	0,007	
10	2,0	1,0	0,0	0,951	0,872	0,912	0,056	

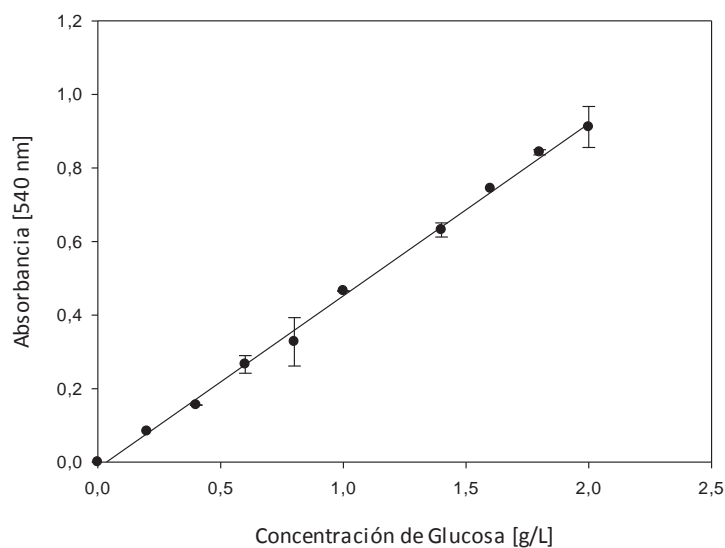


Figura B.4: Curva de calibrado glucosa.

Desde la regresión lineal se obtuvo la siguiente ecuación y su respectivo coeficiente de correlación al eliminar en punto nº 6 de ambas absorbancias.

$$\text{Absorbancia} = 0,4686 * [\text{glucosa}] - 0,0163$$

$$R^2 = 0,9977$$

APÉNDICE B.4: Curva de calibrado de *Ácido Crotonico*

Se preparó una solución madre de ácido crotonico de concentración 400 [mg/L], la cual se diluyó con agua mili Q, para obtener una curva de calibrado a las siguientes concentraciones: 2, 16, 64, 96, 160 y 224 [mg/L], obteniéndose los siguientes resultados:

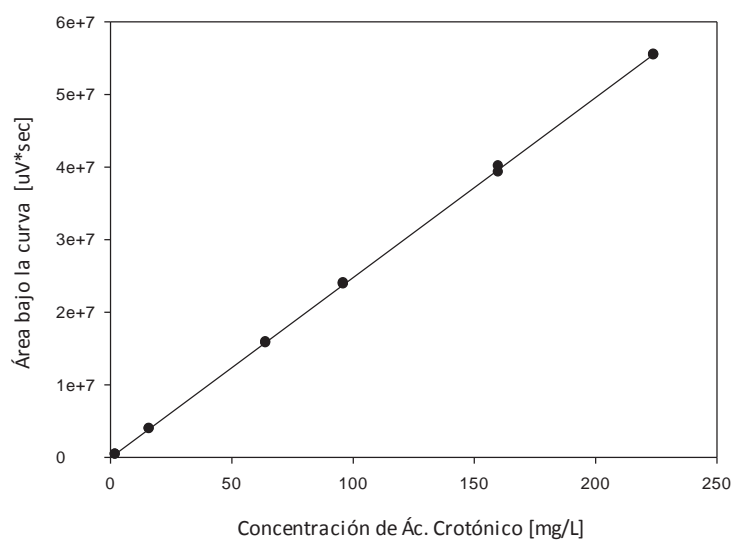


Figura B.4: Curva de calibrado de *Ácido Crotonico*

La ecuación de la recta correspondiente a la Figura B.4 es:

$$\text{Área} = 247970 * [\text{Concentración}] - 17625$$

$$R^2 = 0,9999$$

APÉNDICE B.5: Curva de calibrado *Peso Molecular*

Se prepararon tres soluciones madres de 5 [mL] cada muestra, cada una posee tres estándares distintos. Se pesaron 2,5 mg de cada estándar y se disolvieron en nitrato de sodio 0,1 M. Luego las muestras madres fueron filtradas con filtros de membrana PDVF, con tamaño de poro de 0,22 μm . A continuación se presentan las agrupaciones de los distintos estándares:

Tabla B.7: Soluciones estándar utilizadas para elaboración de curva de calibrado Peso Molecular.

Estándar	Peso molecular 1 [Da]	Peso molecular 2 [Da]	Peso molecular 3 [Da]
A	342 (Sacarosa comercial Merck)	$2,28 \times 10^4$	$21,2 \times 10^4$
B	$0,59 \times 10^4$	$4,73 \times 10^4$	$40,4 \times 10^4$
C	$1,18 \times 10^4$	$11,2 \times 10^4$	$78,8 \times 10^4$

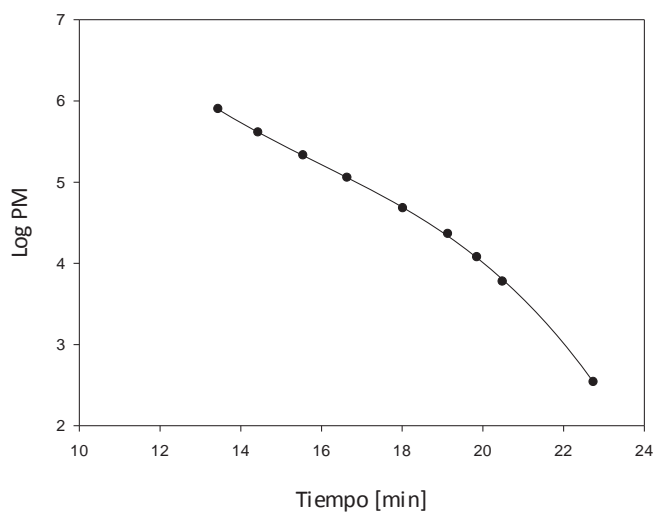


Figura B.5: Curva de calibrado Peso Molecular

La ecuación de la recta correspondiente a la Figura B.5 es:

$$\text{Log PM} = -0,0032 * \text{tiempo}^3 + 0,1528 * \text{tiempo}^2 - 2,6808 * \text{tiempo} + 22,085$$

$$R^2 = 0,9998$$

APÉNDICE C: RESULTADOS

APÉNDICE C.1: Método de cuantificación de biomasa

A continuación en las Figuras C.1 y C.2 se muestra la diferencia de perfiles de concentración de biomasa en cultivos realizados en matraces para las cepas *A. vinelandii* ATCC 9046 y AT12 con sacarosa o glucosa como fuente de carbono, utilizando diferentes técnicas de cuantificación de biomasa en cultivos realizados en matraces. La primera que se utilizó fue la técnica de espectrofotometría directa, para la cual se tomó una muestra directamente desde el caldo de cultivo, luego se utilizó la misma técnica de espectrofotometría pero con lavado, ya que la muestra se tomó luego de un lavado previo de la biomasa y finalmente la última técnica utilizada fue la del peso seco.

Con los resultados obtenidos, se puede demostrar que existen diferencias en cuanto a la cuantificación de biomasa según cada método implementado, pueden ser producidas por las sales presentes en el medio de cultivo o por el aumento de la concentración del alginato en el medio, las cuales afecten la medición de la biomasa por el método espectrofotométrico directo y con lavado. En el caso de la cepa AT12 estas diferencias en cuantificación de biomasa son mínimas (ver Figura C.2) en comparación con la cepa ATCC 9046, en el cual se observa una clara diferencia en la cuantificación, ya que esta cepa acumula PHB (ver Figura C.1). Por estos motivos se tomó la decisión de cuantificar y presentar la biomasa por el método de peso seco para todas las fermentaciones posteriores a realizar.

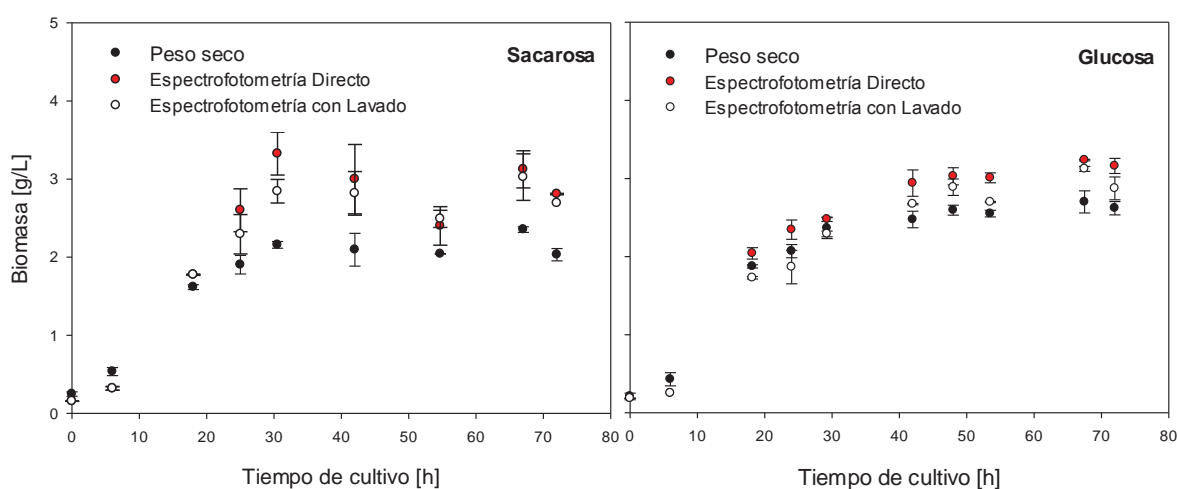


Figura C.1: Diferencia perfiles de crecimiento de biomasa en cultivos de *A. vinelandii* ATCC 9046 utilizando diferentes técnicas de medición: espectrofotometría y peso seco.

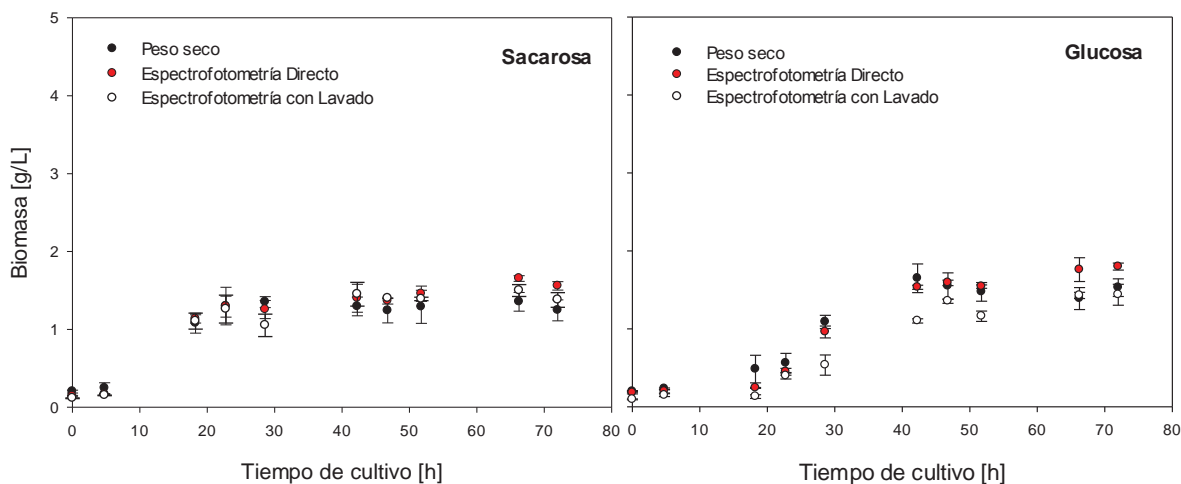


Figura C.2: Diferencia de perfiles de crecimiento de biomasa en cultivos de *A. vinelandii* AT12 utilizando diferentes técnicas de medición: espectrofotometría y peso seco.

APÉNDICE C.2: Ajustes de los cultivos en matraces

Para obtener los ajustes correspondiente a cada uno de los cultivos en matraces se utilizó el software SigmaPlot versión 12.5.

En las Tablas C.1, C.2 y C.3 se presentan las ecuaciones que representan los ajustes de crecimiento de biomasa, consumo de la fuente de carbono y producción de alginato respectivamente, para ambas cepas de *A. vinelandii* utilizando sacarosa o glucosa como fuente de carbono.

Tabla C.1: Ajustes crecimiento de biomasa para las cepas *A. vinelandii* ATCC 9046 y AT12, utilizando sacarosa o glucosa como fuente de carbono.

Cepa	Fuente de carbono	Ajuste crecimiento de Biomasa	R ²
ATCC 9046	Sacarosa	$Biomasa (g/L) = \frac{2,14}{\left(1 + e^{\left(\frac{-t-11,92}{5,58}\right)}\right)}$	0,9824
	Glucosa	$Biomasa(g/L) = \frac{2,58}{\left(1 + e^{\left(\frac{-t-14,06}{5,71}\right)}\right)}$	0,991
AT12	Sacarosa	$Biomasa (g/L) = \frac{1,31}{\left(1 + e^{\left(\frac{-t-10,36}{4,45}\right)}\right)}$	0,983
	Glucosa	$Biomasa (g/L) = 0,24 + \frac{1,29}{\left(1 + e^{\left(\frac{-t-26,01}{3,83}\right)}\right)}$	0,9814

Tabla C.2: Ajustes consumo de fuente de carbono para las cepas *A. vinelandii* ATCC 9046 y AT12, utilizando sacarosa o glucosa como fuente de carbono.

Cepa	Fuente de carbono	Ajuste consumo de fuente de carbono	R ²
ATCC 9046	Sacarosa	$\text{Sacarosa (g/L)} = 26,56 + \frac{-16,63}{\left(1 + e^{\left(\frac{-t-30,57}{1,77}\right)}\right)^{0,04}}$	0,9963
	Glucosa	$\text{Glucosa (g/L)} = 8,7 + \frac{11,31}{\left(1 + e^{\left(\frac{-t-4,37}{-0,1}\right)}\right)^{0,0049}}$	0,9845
AT12	Sacarosa	$\text{Sacarosa (g/L)} = 14,74 + \frac{5,77}{\left(1 + e^{\left(\frac{-t-18,34}{-6,24}\right)}\right)}$	0,9929
	Glucosa	$\text{Glucosa (g/L)} = 13,63 + \frac{6,26}{\left(1 + e^{\left(\frac{-t-27,85}{-4,41}\right)}\right)}$	0,9968

Tabla C.3: Ajustes producción de alginato para las cepas *A. vinelandii* ATCC 9046 y AT12, utilizando sacarosa o glucosa como fuente de carbono.

Cepa	Fuente de carbono	Ajuste producción de alginato	R ²
ATCC 9046	Sacarosa	$\text{Alginato (g/L)} = \frac{0,97}{\left(1 + e^{\left(\frac{-t-12,3}{7,28}\right)}\right)}$	0,9916
	Glucosa	$\text{Alginato (g/L)} = \frac{1,01}{\left(1 + e^{\left(\frac{-t-12,37}{10,17}\right)}\right)}$	0,9812
AT12	Sacarosa	$\text{Alginato (g/L)} = \frac{2,04}{\left(1 + e^{\left(\frac{-t-11,45}{8,18}\right)}\right)}$	0,9837
	Glucosa	$\text{Alginato (g/L)} = 1,94 + \frac{-1,66}{\left(1 + e^{\left(\frac{-t-27,63}{-8,25}\right)}\right)}$	0,9997

APÉNDICE C.3: Ajustes de los cultivos en biorreactor

Para obtener los ajustes correspondiente a cada uno de los cultivos en biorreactor se utilizó el software SigmaPlot versión 12.5.

En las Tablas C.4, C.5 y C.6 se presentan las ecuaciones que representan los ajustes de crecimiento de biomasa, consumo de sacarosa y producción de alginato respectivamente, para la cepa *A. vinelandii* AT12 utilizando sacarosa como fuente de carbono a diferentes velocidades de agitación.

Tabla C.4: Ajustes crecimiento de biomasa para la cepa *A. vinelandii* AT12, a diferentes velocidades de agitación.

Velocidad de agitación [rpm]	Ajuste crecimiento de Biomasa	R ²
300	$Biomasa (g/L) = 1,61 + \frac{-1,39}{\left(1 + e^{\left(\frac{-t-17,0,3}{-4,49}\right)}\right)}$	0,9819
500	$Biomasa (g/L) = \frac{2,69}{\left(1 + e^{\left(\frac{-t-22,2}{9,71}\right)}\right)}$	0,9938
700	$Biomasa (g/L) = \frac{3,21}{\left(1 + e^{\left(\frac{-t-21,55}{9,11}\right)}\right)}$	0,9947

Tabla C.5: Ajustes consumo de sacarosa para la cepa *A. vinelandii* AT12, a diferentes velocidades de agitación.

Velocidad de agitación [rpm]	Ajuste consumo de sacarosa	R ²
300	$Sacarosa (g/L) = 8,57 + \frac{15,76}{\left(1 + e^{\left(\frac{-t-16,52}{-16,60}\right)}\right)}$	0,9955
500	$Sacarosa (g/L) = 5,99 + \frac{13,55}{\left(1 + e^{\left(\frac{-t-18,04}{-4,82}\right)}\right)^{0,4}}$	0,9961
700	$Sacarosa (g/L) = 21,91 + \frac{-21,32}{\left(1 + e^{\left(\frac{-t-21,87}{-8,59}\right)}\right)}$	0,9989

Tabla C.6: Ajustes producción de alginato para la cepa *A. vinelandii* AT12, a diferentes velocidades de agitación.

Velocidad de agitación [rpm]	Ajuste producción de alginato	R ²
300	$\text{Alginato (g/L)} = 2,43 + \frac{-2,08}{\left(1 + e^{\left(\frac{-t-24,12}{-8,61}\right)}\right)}$	0,9975
500	$\text{Alginato (g/L)} = 0,26 + \frac{3,33}{\left(1 + e^{\left(\frac{-t-18,46}{5,95}\right)}\right)}$	0,9866
700	$\text{Alginato (g/L)} = 0,16 + \frac{4,32}{\left(1 + e^{\left(\frac{-t-24,80}{6,94}\right)}\right)}$	0,9882

En las Tablas C.7 presentan las ecuaciones que representan los ajustes de crecimiento de biomasa, consumo de sacarosa y producción de alginato respectivamente, para la cepa *A. vinelandii* ATCC 9046 utilizando sacarosa como fuente de carbono a una velocidad de agitación de 500 [rpm].

Tabla C.7: Ajustes crecimiento de biomasa, consumo de sacarosa y producción de alginato para la cepa *A. vinelandii* ATCC 9046 a 500 [rpm].

Ajustes	R ²
$\text{Biomasa (g/L)} = \frac{4,73}{\left(1 + e^{\left(\frac{-t-15,88}{4,24}\right)}\right)}$	0,9973
$\text{Sacarosa (g/L)} = 4,39 + \frac{15,71}{\left(1 + e^{\left(\frac{-t-17,42}{-5,28}\right)}\right)}$	0,9931
$\text{Alginato (g/L)} = -0,21 + \frac{2,38}{\left(1 + e^{\left(\frac{-t-9,48}{5,71}\right)}\right)}$	0,9953

