

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**ESTUDIO DEL CONSUMO DE POTENCIA Y DE LA VELOCIDAD
DE TRANSFERENCIA Y CONSUMO DE OXÍGENO EN CULTIVOS
DE *Bacillus velezensis* 83 EN MATRACES AGITADOS PARA LA
PRODUCCIÓN DE ÁCIDO γ -POLIPLUTÁMICO**

TESIS

Para obtener el título de

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

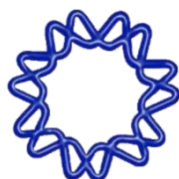
Presenta:

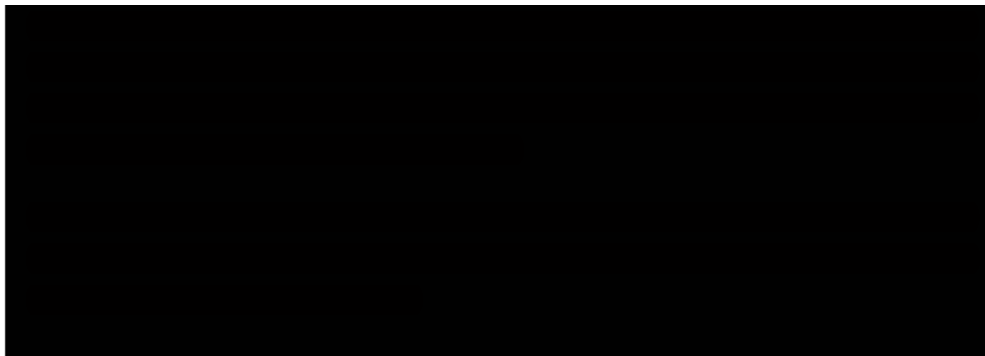
ABRAHAM MEDINA VALDEZ

Asesores de tesis:

DRA. CELIA FLORES OCAMPO

DR. DELFINO REYES CONTRERAS





[REDACTED]

[REDACTED]



ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
ÍNDICE DE TABLAS.....	VI
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
OBJETIVOS.....	5
Objetivo general.....	5
Objetivos específicos.....	5
CAPÍTULO 1.....	6
1. ANTECEDENTES.....	6
1.1 Generalidades de los matraces agitados.....	6
1.2 Velocidad de transferencia de oxígeno en procesos microbianos.....	6
1.2.1 Parámetros que afectan la velocidad de transferencia de oxígeno en matraces agitados.....	8
1.3 Consumo de potencia volumétrica.....	8
1.3.1 Parámetros que afectan el consumo de potencia volumétrica.....	10
1.4 <i>Bacillus velezensis</i> 83.....	11
1.5 El ácido γ -poliglutámico: características y aplicaciones.....	12
1.5.1 Aplicaciones del PGA.....	13
1.5.2 Biosíntesis de PGA por <i>Bacillus sp.</i>	14
1.5.3 Factores que influyen en la producción de PGA.....	14
1.6 Efecto de las condiciones de cultivo sobre la producción y el peso molecular del PGA.....	16
1.7 Efecto del PGA sobre la viscosidad del caldo de cultivo.....	18
1.8 Producción de acetoína y 2,3-butanodiol.....	20
CAPÍTULO 2.....	21
2. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	21
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
3.1 Microorganismo.....	23
3.1.1 Conservación de la cepa.....	23

3.2 Medios de cultivo.....	23
3.2.1 Medio mineral.....	23
3.2.2 Medio YPG (por sus siglas en inglés: Yeast, Peptone, Glucose).....	24
3.3 Cultivos en matraces agitados.....	24
3.3.1 Condiciones de cultivo para la evaluación de la velocidad de transferencia de oxígeno y el consumo de potencia.....	24
3.3.2 Sistemas de medición de velocidad de transferencia de oxígeno y consumo de potencia.....	25
3.3.2.1 Sistema de monitoreo de actividad respiratoria en línea.....	25
3.3.2.2 Equipo de medición de consumo de potencia.....	27
3.3.3 Desarrollo del inóculo para los cultivos en matraces agitados para la evaluación de la VTO y la P/V	28
3.4 Técnicas Analíticas.....	29
3.4.1 Conteo celular.....	29
3.4.2 Determinación de proteína.....	30
3.4.3 Glucosa residual.....	32
3.4.3.1 Glucosa residual por DNS.....	32
3.4.3.2 Glucosa residual por YSI.....	33
3.4.4 Amonio Residual.....	34
3.4.5 Determinación de la concentración de PGA.....	35
3.4.6 Determinación del peso molecular del PGA.....	36
3.4.7 Determinación de acetoína, 2,3-butanodiol y ácido acético.....	36
3.4.8 Determinación de la viscosidad del caldo de cultivo.....	39
3.4.9 Análisis estadístico.....	39
CAPÍTULO 3.....	40
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
4.1 Crecimiento celular y velocidad de transferencia de oxígeno.....	40
4.2 Producción de 2,3-butanodiol, acetoína y ácido acético.....	45
4.3 Coeficiente de respiración.....	47
4.4 Consumo de potencia volumétrica y viscosidad del caldo de cultivo.....	49
4.5 Producción y peso molecular del PGA.....	53
4.6 Características reológicas del caldo de cultivo.....	56

CAPÍTULO 4.....	60
5. CONCLUSIONES.....	60
6. PERSPECTIVAS.....	61
7. REFERENCIAS.....	62
8. ANEXOS.....	67
Anexo 1. Valores de torque en la calibración de las diferentes condiciones de cultivo para la determinación del consumo de potencia.....	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. <i>a)</i> Consumo de potencia en matraces de 250 mL de volumen nominal agitados a diferentes velocidades y utilizando diferentes volúmenes de llenado, con un diámetro de agitación de 2.5 cm (los símbolos cerrados muestran la reproducibilidad del experimento tres meses después) y <i>b)</i> consumo de potencia en matraces de diferente tamaño (100 – 2000 mL) con volumen de llenado en una relación 1/10 y dos diámetros de agitación: 2.5 cm (símbolos abiertos y línea continua) y 5 cm (símbolos cerrados y línea punteada). Adaptado de Büchs <i>et al.</i> , 2000a....	11
Figura 1.2. Estructura química del ácido γ -poliglutámico.....	12
Figura 1.3. Efecto de la VTO teórica sobre <i>a)</i> la producción y <i>b)</i> el peso molecular del PGA producido por <i>Bacillus licheniformis</i> NCIM 2324. Cálculos realizados a partir de los resultados y condiciones de operación y características del reactor reportados por Bajaj y Singhal (2010).....	17
Figura 1.4. Relación de la VTO sobre la viscosidad del caldo de cultivo de cultivos de <i>Bacillus licheniformis</i> en matraces agitados. Adaptado de Wilming <i>et al.</i> , 2013.....	19
Figura 2.1. Esquema general de la estrategia experimental desarrollada en el presente trabajo.....	22
Figura 3.1. Sistema de monitoreo de actividad respiratoria en línea (RAMOS). En <i>a)</i> se muestra una vista general del equipo que consta de una plataforma de agitación (1) y un controlador de temperatura (2). En <i>b)</i> se muestran los aditamentos del matraz que son una válvula de entrada y salida de aire (3 y 4, respectivamente), un sensor de oxígeno (5) y un puerto de inoculación (6)....	25
Figura 3.2. Presión parcial de oxígeno durante un ciclo de medición de la VTO en el sistema RAMOS. (Tomado de Anderlei y Büchs, 2001).....	26
Figura 3.3. Equipo de medición de potencia en línea. <i>a)</i> Plataforma de agitación, <i>b)</i> control de temperatura, <i>c)</i> control de agitación y torque y <i>d)</i> sensor de torque (Pliego, 2014).....	28
Figura 3.4. Cuadrícula de una cámara de Neubauer. El círculo señala el cuadrante en que se contaron las células de <i>Bacillus velezensis</i> 83.....	30
Figura 3.5. Cromatograma típico en HPLC de <i>a)</i> ácido acético y <i>b)</i> 2,3-butanodiol y una isómero del 2,3-butanodiol (utilizando un detector de índice de refracción, Waters 2414), y de <i>c)</i> acetoína (utilizando un detector de arreglo de diodos, Waters 2996, a una longitud de onda de 210 nm)....	38
Figura 4.1. <i>a)</i> Perfiles de velocidad de transferencia de oxígeno, <i>b)</i> crecimiento celular como cuenta total y <i>c)</i> proteína en cultivos de <i>B. velezensis</i> 83 desarrollados en matraces a diferentes velocidades de agitación y volúmenes de llenado.....	41
Figura 4.2. <i>a)</i> Consumo de glucosa y <i>b)</i> consumo de amonio en cultivos de <i>B. velezensis</i> 83 desarrollados bajo diferentes velocidades de transferencia de oxígeno.....	44

Figura 4.3. Producción de <i>a)</i> 2,3-butanodiol, <i>b)</i> acetoina y <i>c)</i> ácido acético en cultivos de <i>B. velezensis</i> 83 desarrollados bajo diferentes velocidades de transferencia de oxígeno.....	46
Figura 4.4. Coeficiente de respiración para los cultivos de <i>B. velezensis</i> 83 desarrollados bajo diferentes velocidades de transferencia de oxígeno	48
Figura 4.5. <i>a)</i> Perfiles de consumo de potencia volumétrica y <i>b)</i> perfiles de viscosidad de cultivos de <i>B. velezensis</i> 83 desarrollados a diferentes velocidades transferencia de oxígeno. Viscosidad aparente medida a una velocidad de deformación de 300 s ⁻¹ . Viscosidad aparente medida a una velocidad de deformación de 300 s ⁻¹	50
Figura 4.6. <i>a)</i> Producción volumétrica de PGA y <i>b)</i> peso molecular del PGA producido en cultivos de <i>B. velezensis</i> 83 desarrollados bajo diferentes velocidades de transferencia de oxígeno.....	54
Figura 4.7. Reogramas de los caldos de cultivo de <i>B. velezensis</i> 83 desarrollados bajo diferentes velocidades de transferencia de oxígeno. Los reogramas corresponden al tiempo de cultivo en que se presentó la máxima viscosidad para cada condición evaluada.....	57
Figura 4.8. Valores de los módulos de almacenamiento (<i>G'</i>) y de pérdida (<i>G''</i>) de energía en función de la frecuencia angular de un cultivo desarrollado a una VTO _{máx} de 19 mmol/L h y de 18 horas de cultivo.....	59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Aplicaciones del PGA en los diferentes sectores industriales.....	13
Tabla 1.2. Producción de PGA en cultivos realizados con cepas de <i>Bacillus</i> cuya biosíntesis de PGA es dependiente de glutamato.....	15
Tabla 1.3. Producción de PGA en cultivos realizados con cepas de <i>Bacillus</i> cuya biosíntesis de PGA es independiente de glutamato.....	16
Tabla 3.1. Composición del medio mineral.....	23
Tabla 3.2. Composición del medio YPG.....	24
Tabla 3.3. Condiciones de operación del cultivo para generar diferentes velocidades de transferencia de oxígeno.....	25
Tabla 4.1. Parámetros cinéticos de <i>B. velezensis</i> 83 cultivado bajo diferentes velocidades de transferencia de oxígeno.....	42
Tabla 4.2. Concentraciones máximas y rendimientos de 2,3-butanodiol, acetoína y ácido acético producidos en cultivos de <i>B. velezensis</i> 83 desarrollados bajo diferentes velocidades de transferencia de oxígeno.....	47
Tabla 4.3. Consumo de potencia volumétrica máxima, energía suministrada y viscosidad máxima de cada cultivo de <i>Bacillus velezensis</i> 83 desarrollados bajo diferentes velocidades de transferencia de oxígeno.....	52
Tabla 4.4. Índices de consistencia (k) y fluidez (n) máximos y su correspondientes producciones y pesos moleculares de PGA de cultivos de <i>B. velezensis</i> 83 desarrollados bajos diferentes velocidades de transferencia de oxígeno.....	57
Tabla 8.1. Valores de torque de calibración para cada condición de cultivo desarrollada en el presente trabajo.....	67

RESUMEN

Bacillus velezensis 83 es una bacteria Gram positiva y formadora de esporas, utilizada a nivel comercial como agente de control biológico en el producto *Fungifree AB*[®]. Sintetiza una gran cantidad de compuestos extracelulares, entre los cuales se encuentra el ácido γ -poliglutámico (PGA, por sus siglas en inglés). El PGA es un polímero conformado por monómeros de ácido D/L-glutámico, y cuyo peso molecular oscila entre los 10 y los 10 000 kDa; es de naturaleza amínica, aniónico, soluble en agua, no tóxico y comestible. Tales características lo convierte en un producto de interés industrial para el diseño de matrices poliméricas, útiles en la liberación controlada de fármacos; como conservador de alimentos, como agente crioprotector o como agente quelante de metales pesados.

La producción de PGA durante el cultivo de *B. velezensis* 83, genera un aumento en la viscosidad del caldo, impactando directamente en el consumo de potencia volumétrica (P/V) y en la velocidad de transferencia de oxígeno (VTO). En cultivos agitados, el oxígeno está involucrado en las actividades metabólicas de la bacteria, por lo que la VTO, se convierte en el parámetro más adecuado para evaluar el crecimiento y el estado fisiológico de un microorganismo aerobio. Por su parte, la P/V determina el mezclado en un biorreactor, debido a que afecta la transferencia de oxígeno y la dispersión de las fases involucradas en el cultivo. En matraces agitados, tanto la VTO como la P/V, se modifican en función de la velocidad de agitación y del volumen de llenado del matraz ($V_{Llenado}$).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la VTO y la P/V sobre el crecimiento de *B. velezensis* 83 y sobre la producción y el peso molecular del PGA. La VTO se modificó a través de cambios en la velocidad de agitación y del $V_{Llenado}$ de los matraces. Se realizaron cultivos en matraces de 250 mL con dos diferentes volúmenes de llenado (15 y 50 mL). En cada $V_{Llenado}$ se evaluaron dos velocidades de agitación: 100 y 200 rpm para 50 mL de $V_{Llenado}$, y 200 y 250 rpm para 15 mL de $V_{Llenado}$.

Los perfiles de VTO demostraron que los cultivos desarrollados a 100 y 200 rpm con 50 mL de $V_{Llenado}$ alcanzaron VTOs de 2.5 y 5.7 mmol/L h; mientras que, para los cultivos desarrollados a 200 y 250 rpm con 15 mL de $V_{Llenado}$, la VTO máxima fue de 17 y 19 mmol/L h. De acuerdo a los valores y perfiles de VTO observados, los cultivos que mostraron VTOs máximas de 2.5 y 5.7 mmol/L h se denominaron como cultivos de baja transferencia de oxígeno, por el contrario, los cultivos que mostraron VTOs de 17 y 19 mmol/L h se denominaron como cultivos de alta transferencia de oxígeno.

Con respecto al consumo de potencia, el cultivo con una VTO de 2.5 mmol/L h se mantuvo en 0.1 kW/m³ durante todo el cultivo; mientras que para los cultivos desarrollados a VTOs de 5.7, 17 y 19 mmol/L h se alcanzaron valores máximos de 0.7, 1.2 y 1.5 kW/m³, respectivamente.

En general, se observó que altas VTOs, favorecieron el crecimiento celular, alcanzando concentraciones celulares de 5.3x10¹² y 6.0x10¹² cel/L para VTOs de 17 y 19 mmol/L h, respectivamente, mientras que, para bajas VTOs de 2.5 y 5.7 mmol/L h, la concentración celular fue de 2.9x10¹² y 3.6x10¹² cel/L, respectivamente. De forma similar, a una baja VTO de 2.5 mmol/L h, la concentración de PGA fue de 0.7 g/L, respecto de una mayor VTO (17 mmol/L h) en donde la producción del polímero incrementó a 2.0 g/L.

La velocidad de síntesis y degradación del polímero estuvieron determinadas directamente por la VTO, Asimismo, la VTO influyó sobre el peso molecular (PM) máximo del polímero sólo para 2.5 mmol/L h, condición en la que se generó un polímero de un peso molecular máximo de 2400 kDa. Para el resto de las condiciones, el PM fue de 2836, 2750 y 2850 kDa, para 5.7, 17 y 19 mmol/L h, respectivamente. Sin embargo, los perfiles de depolimerización (disminución del PM con respecto al tiempo de cultivo) fueron diferentes demostrando que con el incremento de la VTO, la depolimerización del PGA se incrementó también.

La producción de acetoína y 2,3-butanodiol se encontró influenciada por la VTO. Para VTOs de 2.5 y 5.7 mmol/L h, la producción de acetoína fue de 3.3 y 2.6 g/L, mientras que para el 2,3-butanodiol, las producciones fueron de 3.1 y 1.3 g/L, respectivamente. Para mayores valores de VTO de 17 y 19 mmol/L, la producción de acetoína fue de 2.0 y 2.4 g/L, respectivamente, mientras que el 2,3-butanodiol se encontró por debajo de los 0.4 g/L.

La caracterización reológica del caldo de cultivo, mostró que éste presenta propiedades pseudoplásticas y viscoelásticas. Se determinó que la viscosidad del caldo de cultivo está influenciada por la concentración del polímero.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, permitieron conocer la actividad respiratoria y el metabolismo de *B. velezensis* 83 y la producción de PGA en función de la VTO, mostrando que a altos valores de VTO, la fuente de carbono es utilizada por la bacteria para el crecimiento celular y para la producción del polímero. En contraste, a bajas VTOs se favoreció la síntesis de metabolitos de reserva. Además, el incremento en la VTO favoreció la depolimerización del PGA, probablemente debido a que la actividad de las enzimas depolimerasas es favorecida a altas VTOs.

INTRODUCCIÓN

En un cultivo aerobio, el oxígeno se convierte en un factor determinante para el crecimiento y mantenimiento celular, y es un sustrato clave para el metabolismo celular, por lo que la velocidad de transferencia de oxígeno se convierte en el parámetro más adecuado para evaluar el crecimiento celular y determinar el estado fisiológico de un cultivo aerobio (Anderlei y Büchs, 2001). La cantidad de oxígeno disuelto en el caldo de cultivo depende de la actividad respiratoria del microorganismo y de la capacidad de transferencia de oxígeno de la fase gaseosa a la fase líquida del sistema, por lo que el suficiente suministro de este, es de vital importancia para evitar una limitación por oxígeno (García-Ochoa *et al.*, 2010).

Un parámetro directamente relacionado con la velocidad de transferencia de oxígeno es el consumo de potencia volumétrica, el cual determina el régimen de flujo y la intensidad del mezclado que impacta en la transferencia de masa y energía, y en la dispersión de las fases involucradas en el cultivo (Suresh *et al.*, 2009).

Los matraces agitados son una herramienta imprescindible dentro del campo de la biotecnología, debido a que permiten realizar una gran cantidad de experimentos de forma simultánea y con el mínimo de supervisión, además de requerir poca cantidad de material, por lo que representan bajos costos de operación. Estas características hacen que los matraces agitados sean ampliamente utilizados para la selección de cepas, la optimización y/o formulación de medios de cultivo, o para determinar parámetros operacionales (Büchs *et al.*, 2000 a y b).

En cultivos de bacterias del género *Bacillus*, se ha observado la producción de ácido γ -poliglutámico, el cual es un polímero extracelular conformado por monómeros de ácido D-glutámico y/o ácido L-glutámico, que presenta pesos moleculares que van desde los 10 hasta los 10 000 kDa. El ácido γ -poliglutámico se caracteriza por ser soluble en agua, aniónico, no tóxico para los humanos y comestible, lo que lo convierte en un producto de interés para su aplicación en los campos de la medicina, alimentación, biorremediación y agricultura (Bajaj y Singhal, 2011).

La acumulación de ácido γ -poliglutámico en el caldo de cultivo genera un incremento en la viscosidad de éste. Se sabe que el incremento en la viscosidad del caldo de cultivo impacta en la velocidad de transferencia de oxígeno y en el consumo de potencia (Giese *et al.*, 2013; Büchs *et al.*, 2000 b), y a su vez, la viscosidad del caldo está influenciada por la producción y el peso molecular del polímero.

De acuerdo con Cromwick *et al.* (1996) y Bajaj y Singhal (2010), para las cepas ATCC 9945A y NCIM 2324 de *Bacillus licheniformis*, respectivamente, la producción del ácido γ -poliglutámico está influenciada por las condiciones de operación como la agitación y aireación (esta última en el caso de la cepa NCIM 2324), específicamente, se ha observado que el incremento en la velocidad de transferencia de oxígeno genera un aumento en la producción del polímero, en contraste, en condiciones de limitación de oxígeno se promueve la producción del ácido γ -poliglutámico de mayor peso molecular.

Estudios realizados con *Bacillus velezensis* 83 para la producción de esporas viables para su aplicación como agente de control biológico han demostrado que la bacteria produce ácido γ -poliglutámico. La producción del polímero genera un incremento en la viscosidad del caldo, lo que provoca una limitación en el mezclado y en la transferencia de oxígeno en el sistema. Sin embargo, no se ha realizado una caracterización de la producción y el peso molecular del ácido γ -poliglutámico y su impacto en la viscosidad del caldo de cultivo y en los fenómenos de transferencia de oxígeno y consumo de potencia volumétrica.

OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar la influencia de la velocidad de transferencia de oxígeno y el consumo de potencia sobre el crecimiento, la producción y el peso molecular del PGA producido por *Bacillus velezensis* 83 en matraces agitados.

Objetivos específicos

- Caracterizar el consumo de potencia y la velocidad de transferencia de oxígeno en cultivos de *Bacillus velezensis* 83 desarrollados en matraces, bajo diferentes velocidades de agitación y volúmenes de llenado.
- Analizar la actividad respirométrica de *Bacillus velezensis* 83 en cultivos en matraces bajo diferentes velocidades de transferencia de oxígeno.
- Evaluar la producción y el peso molecular del PGA producido por *Bacillus velezensis* 83 en matraces bajo diferentes velocidades de transferencia de oxígeno.

CAPÍTULO 1

1. ANTECEDENTES

1.1 Generalidades de los matraces agitados

Los matraces agitados son una herramienta muy valiosa dentro de la industria y la investigación biotecnológica, han sido ampliamente utilizados para la selección y mejoramiento de cepas, optimización y formulación de medios de cultivo, determinación de condiciones de operación, obtención de productos de interés y para el desarrollo de numerosos experimentos en el área de bioprocesos (Büchs, 2001).

Una de las características que hacen de los matraces agitados un sistema eficiente, es su alta transferencia de masa y energía, dada por su diseño mecánico simple, que permite realizar múltiples experimentos de forma simultánea y con poca supervisión (Büchs, 2001).

Debido a que los matraces agitados son ampliamente utilizados, es importante conocer los procesos físicos y químicos que ocurren en su interior, especialmente la velocidad de transferencia de oxígeno (VTO) y el consumo de potencia volumétrica (P/V). Ambos son parámetros importantes a tener en cuenta durante el desarrollo de cultivos agitados. Por un lado, la P/V tiene una influencia directa sobre la transferencia de masa, la intensidad del mezclado, el régimen de flujo, el estrés hidromecánico, etc. (Suresh *et al.*, 2009; Büchs *et al.*, 2000 a y b). Por otro lado, la VTO influye en el estado fisiológico de un cultivo aerobio, además permite identificar fenómenos biológicos como limitación por oxígeno, limitación por sustrato o crecimiento diaúxico (Anderlei y Büchs, 2001).

1.2 Velocidad de transferencia de oxígeno en procesos microbianos

En cultivos aerobios, el oxígeno juega un papel de vital importancia, siendo un sustrato esencial para el crecimiento y mantenimiento celular, ya que la mayoría de las actividades metabólicas dependen del consumo de oxígeno. Así, la velocidad de transferencia de oxígeno es el parámetro más adecuado para conocer el estado fisiológico de un cultivo aerobio (Anderlei y Büchs, 2001).

La concentración de oxígeno disuelto en un cultivo celular depende de la velocidad de consumo de oxígeno por la célula y de la velocidad de transferencia de la fase gaseosa a la fase líquida.

La ecuación que describe la VTO en un matraz agitado es:

$$VTO = K_L a L_{O_2} (p_{O_2 \text{ gas}} - p_{O_2 \text{ liquido}}) \quad (\text{ec. 1})$$

donde VTO es la velocidad de transferencia de oxígeno (en $mol/L h$) y es proporcional al coeficiente de transferencia de masa k_L (en m/h) que depende del coeficiente de difusión, que a su vez depende de la concentración de iones en el medio y de la viscosidad de la fase líquida, a es el área específica de transferencia de masa (en m^2/m^3) y en el matraz agitado es determinada por la interfase gas-líquido y solo es afectada por la viscosidad de la solución; L_{O_2} es la solubilidad del oxígeno (en $mol/L bar$) y $(p_{O_2, \text{gas}} - p_{O_2, \text{liquido}})$ es la diferencia de presión en la interface gas-líquido (en bar) (Maier y Büchs, 2001).

Mediante el empleo del sistema de monitoreo de actividad respiratoria en línea (RAMOS por sus siglas en inglés), desarrollado por Anderlei y Büchs (2001), es posible conocer, en línea, la VTO de un cultivo bacteriano en matraz agitado mediante el uso de la ecuación 2, como se describe a continuación,

$$VTO = \frac{\Delta p_{O_2}}{\Delta t} \cdot \frac{V_G}{R \cdot T \cdot V_{Llenado}} \quad (\text{ec. 2})$$

donde, Δp_{O_2} es el cambio en la presión parcial del oxígeno en la parte superior del matraz (en bar), Δt es el tiempo de la fase de medición (en h), V_G es el volumen del gas (en L), $V_{Llenado}$ es el volumen del llenado (en L), R es la constante de los gases (en $bar L/mol K$) y T es la temperatura (en K).

1.2.1 Parámetros que afectan la velocidad de transferencia de oxígeno en matraces agitados

La forma y el tamaño del matraz, la frecuencia de agitación, el diámetro de agitación, el volumen de llenado y las propiedades fisicoquímicas del medio (viscosidad, solubilidad y difusividad) son parámetros que afectan la VTO en cultivos desarrollados en matraces agitados.

Dependiendo del tipo de material con que es fabricado el matraz, ya sea vidrio o plástico, éste presenta la propiedad de ser hidrofóbico (en el caso del plástico) o hidrofílico (en el caso del vidrio), éste último permite la formación de una película líquida en las paredes internas del matraz que, a su vez, contribuye en el área específica de transferencia de masa, a , incrementando así la VTO (Maier y Büchs, 2001). La geometría y el tamaño del matraz influyen en el régimen de flujo dentro del matraz (Büchs *et al.*, 2000b) que incide sobre el área específica de transferencia de masa. La presencia de baffles dentro del matraz ofrece una alta VTO a una baja frecuencia de agitación; sin embargo, los valores de VTO para cada matraz pueden ser diferentes debido a que éstos son formados manualmente, por lo que la forma, el tamaño y la distribución de los baffles dentro del matraz no son comparables (Büchs, 2001). Además, generan regímenes de flujo turbulento y una mayor resistencia al flujo dentro del matraz (Peter *et al.*, 2006).

A la par con el tipo de tapón y el nivel de ajuste que tenga en el matraz, el movimiento del fluido en los matraces bafleados afectan la VTO; éste último puede provocar el humedecimiento de los tapones, ocasionando cambios en la resistencia en el intercambio de gases a través de estos, además de ser más propensos a contaminaciones (McDaniel y Bailey, 1969).

1.3 Consumo de potencia volumétrica

El consumo de potencia por unidad de volumen (P/V), es la energía entregada al fluido dentro del matraz. Es responsable del movimiento del líquido durante la agitación y es disipada como calor, debido a la fricción generada entre el fluido en movimiento y las paredes internas y el fondo del matraz (Klößner y Büchs, 2011).

Una definición adimensional del consumo de potencia en matraces agitados, se da mediante el número de Newton modificado (Ne'), descrita por la ecuación 3 (Büchs *et al.*, 2000a).

$$Ne' = \frac{P}{\rho \cdot n^3 \cdot d^4 \cdot V_{Llenado}^{1/3}} \quad (\text{ec. 3})$$

Donde P es la potencia (en W), ρ es la densidad del líquido (en Kg/m^3), n es la frecuencia de agitación (en s^{-1}), d es el diámetro interno máximo del matraz (en m) y $V_{Llenado}$ es el volumen de llenado del matraz (en m^3).

Una descripción directa del consumo de potencia por unidad de volumen (P/V), se establece de acuerdo con la siguiente expresión (Büchs *et al*, 2000a):

$$\frac{P}{V} = Ne' \cdot \rho \cdot \frac{n^3 \cdot d^4}{V_{Llenado}^{2/3}} \quad (\text{ec. 4})$$

Büchs *et al.* (2000a), desarrollaron un método basado en las mediciones del torque de un sistema agitador que permite determinar de manera confiable el consumo de potencia por unidad de volumen en matraces agitados, sin baffles, de volumen nominal menor a 1 L y con líquido de baja viscosidad. El modelo que se ajusta a los datos medidos en matraces agitados es el siguiente:

$$\frac{P}{V} = \frac{(M_1 - M_2) \cdot 2 \cdot \pi \cdot n}{z \cdot V_{Llenado}} \quad (\text{ec. 5})$$

donde, $(M_1 - M_2)$ es la diferencia del torque de la plataforma agitadora (en $N m$) medido con medio líquido (M_1) y con medio sólido (M_2), que representa una compensación de las pérdidas por fricción del líquido en movimiento, $2 \cdot \pi \cdot n$ es la velocidad angular (ω) donde n es la frecuencia de agitación (en s^{-1}). $V_{Llenado}$ es el volumen de llenado (en m^3) y z es el número de matraces sobre la plataforma.

1.3.1 Parámetros que afectan el consumo de potencia volumétrica

Condiciones de operación como el tamaño del matraz, el volumen de llenado, la velocidad de agitación y la viscosidad del fluido impactan directamente el consumo de potencia.

Büchs *et al.* (2000a), evaluaron la influencia del volumen de llenado (10 - 50 mL) y la velocidad de agitación (80 – 400 rpm) sobre el consumo de potencia en matraces de 250 mL con un diámetro de agitación de 2.5 cm. Los autores observaron, por un lado, que el consumo de potencia aumentó conforme se incrementó la velocidad de agitación (Figura 1.1a); por otro lado, al incrementarse el volumen de llenado, el consumo de potencia disminuyó, hecho atribuido a que el área de fricción entre las paredes internas del matraz y el líquido no aumentó proporcionalmente. Así mismo, al evaluar la influencia del tamaño del matraz (100 – 2000 mL de volumen nominal) y el diámetro de agitación (2.5 y 5 cm) sobre el consumo de potencia (Figura 1.1b), observaron que a una misma velocidad de agitación, la potencia incrementó al aumentar el tamaño del matraz, esto debido al aumento de la velocidad de rotación del líquido a través de las paredes internas del matraz. Por su parte, a baja viscosidad, el diámetro de agitación no influyó significativamente en el consumo de potencia.

Frecuentemente, el incremento en la viscosidad del caldo de cultivo (debido a la producción de polímeros extracelulares y/o al crecimiento micelial de algunos hongos) conduce a un incremento en el consumo de potencia. Peña *et al.* (2007) evaluaron el consumo de potencia de diferentes soluciones de alginato bacteriano (1 - 5 g/L) en función de la velocidad de agitación (120 -300 rpm), en matraces de 500 mL con 100 mL de V_{Llenado} . Observaron que para una misma velocidad de agitación, el consumo de potencia aumentó al incrementarse la concentración de alginato y por tanto la viscosidad del medio de cultivo.

En diferentes trabajos realizados con cepas de *Bacillus* (Richard y Margaritis, 2002; Bajaj y Singhal, 2010; Meissner *et al.*, 2015), se ha reportado un incremento en la viscosidad del caldo de cultivo, ocasionado por la producción de ácido γ -poliglutámico. Dado que el incremento en la viscosidad del caldo impacta directamente en el consumo de potencia volumétrica y en la velocidad de transferencia de oxígeno y que a su vez, la VTO influye en la producción del polímero, es importante conocer la interrelación que existe entre estos parámetros.

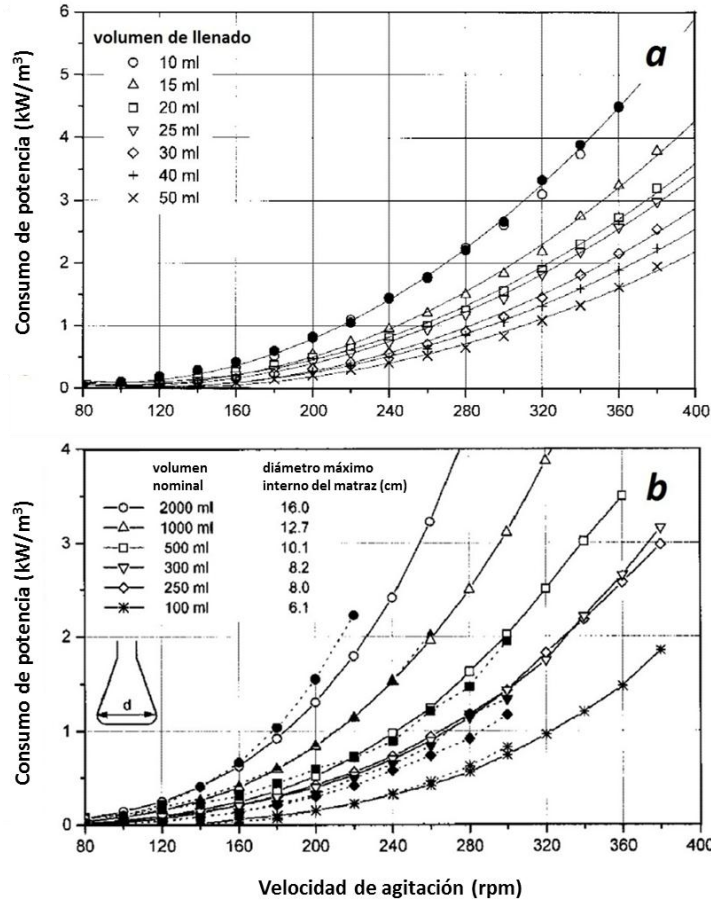


Figura 1.1. a) Consumo de potencia en matraces de 250 mL de volumen nominal agitados a diferentes velocidades y utilizando diferentes volúmenes de llenado, con un diámetro de agitación de 2.5 cm (los símbolos cerrados muestran la reproducibilidad del experimento tres meses después) y **b)** consumo de potencia en matraces de diferente tamaño (100 – 2000 mL) con volumen de llenado en una relación 1/10 y dos diámetros de agitación: 2.5 cm (símbolos abiertos y línea continua) y 5 cm (símbolos cerrados y línea punteada). Adaptado de Büchs *et al.*, 2000a.

1.4 *Bacillus velezensis* 83

Las especies del género *Bacillus* se distinguen por ser bacterias Gram positivas y formadoras de esporas. Una spora tiene la capacidad de sobrevivir por periodos prolongados, aún en condiciones de limitación de nutrientes. Además, cuando las condiciones del ambiente son favorables, es capaz de regresar a su estado vegetativo.

Bacillus velezensis 83 (anteriormente identificada como *Bacillus amyloliquefaciens* 83) fue aislada del follaje de cultivos de mango por el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Unidad

Culiacán, como un antagonista para combatir la enfermedad de la antracnosis causada por *Colletotrichum gloeosporioides* (Galindo *et al.*, 2005).

La bacteria posee la capacidad de sintetizar compuestos con actividad antimicrobiana como bacilomicina D y surfactina (Solís, 2010), que le confieren potencial inhibitorio contra un amplio rango de patógenos, por lo que, a la par con su capacidad de formar esporas, han hecho de *B. velezensis* 83 un organismo idóneo para la elaboración de productos para el control biológico, como lo es *Fungifree AB*[®], biofungicida elaborado a base de esporas de *B. velezensis* 83.

1.5 El ácido γ -poliglutámico: características y aplicaciones

El ácido γ -poliglutámico (PGA por sus siglas en inglés), es un homopoliaminoácido extracelular conformado por monómeros de ácido D-glutámico y/o ácido L-glutámico, o ambos, unidos por un enlace peptídico entre los grupos α -amino y γ -carboxilo (Luo *et al.*, 2016), cuya estructura química puede apreciarse en la Figura 1.2. El peso molecular del PGA se encuentra entre los 10 y los 10 000 kDa (Shih y Van, 2001), es producido principalmente por bacterias pertenecientes al género *Bacillus*, aunque también se ha reportado su producción por algunas arqueobacterias del género *Natrialba* (Hezayen *et al.*, 2001) y por *Fusobacterium nucleatum* (Candela *et al.*, 2009). El PGA es un polímero biodegradable, aniónico, soluble en agua, comestible, no inmunogénico y no tóxico para los humanos, por lo que puede ser utilizado en un amplio rango de aplicaciones industriales (Bajaj y Singhal, 2011).

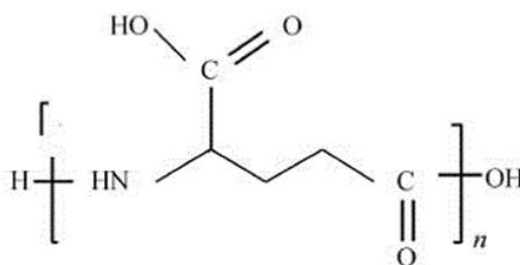


Figura 1.2. Estructura química del ácido γ -poliglutámico.

1.5.1 Aplicaciones del PGA

El PGA es utilizado para una amplia variedad de propósitos en los diferentes sectores industriales, entre los cuales se encuentran: el desarrollo de conjugados PGA-fármaco que permitan incrementar la efectividad y prolongar el tiempo de acción del fármaco, la elaboración de matrices poliméricas que permitan el anclaje y el crecimiento celular; o como un agente que potencia las propiedades exfoliantes, hidratantes y humectantes de los productos cosméticos (Luo *et al.*, 2016). En la Tabla 1.1 se presentan algunas de las aplicaciones del PGA y su función en los diferentes sectores industriales.

Tabla 1.1. Aplicaciones del PGA en los diferentes sectores industriales.

Área de aplicación	Función
Medicina	Liberación controlada de fármacos Facilita la administración y reduce la toxicidad de agentes quimioterapéuticos Diseño de adhesivos biológicos que sean degradados por el organismo Diseño de matrices poliméricas que permitan el anclaje y el crecimiento celular
Alimentaria	Clarifica y mejora el sabor de jugos y bebidas Mejora la textura de los alimentos y alarga su tiempo de conservación Ayuda a la asimilación de calcio y otros metales en el intestino delgado Aumenta la viabilidad de probióticos durante su almacenamiento en congelación
Biorremediación	Elaboración de floculantes para la remoción de colorantes en aguas residuales Absorción y recuperación de metales pesados en aguas industriales Diseño de bioplásticos como sustitutos a los de origen petroquímico
Cosmética	Utilizado como humectante e hidratante Estimula la producción de ácido láctico como agente hidratante Utilizado como agente protector contra la radiación solar Ayuda a mantener la elasticidad de la piel Forma una barrera protectora entre la piel y los químicos de los maquillajes
Agricultura	Favorece el desarrollo radicular de las plantas, mejorando así la absorción de nutrientes Aumenta la retención de agua en el suelo Ayuda a una liberación controlada de nutrientes en el suelo

Adaptado de Tanimoto *et al.*, 2007; Bajaj y Sinhal, 2011 y Luo *et al.*, 2016.

1.5.2 Biosíntesis de PGA por *Bacillus sp.*

Las bacterias productoras de PGA se clasifican en dos tipos. Las bacterias independientes de glutamato (precursor del PGA) y las dependientes de glutamato.

Las bacterias independientes de glutamato producen el precursor de forma endógena, por conversión de la fuente de carbono a α -cetoglutarato (a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos) y posterior conversión a ácido L-glutámico. Por su parte, las bacterias dependientes de glutamato obtienen el precursor de forma exógena, es decir, el glutamato es incorporado a la célula desde el medio de cultivo.

La polimerización del PGA se lleva a cabo en el complejo PgsBCA sintetasa que se encuentra anclado a la membrana celular. Para incorporar unidades de D-glutamato a la cadena de PGA en crecimiento, el L-glutamato debe ser convertido a D-glutamato mediante una reacción de racemización por la glutamato racemasa, para su posterior polimerización y transporte a través de la membrana celular para ser expulsado fuera de la célula. Las reacciones de racemización, polimerización y transporte, se llevan a cabo en el complejo PgsBCA sintetasa (Ogunleye *et al.*, 2015).

1.5.3 Factores que influyen en la producción de PGA

Con el objetivo de incrementar la producción del PGA, diversos trabajos de investigación se han enfocado en optimizar las condiciones de cultivo que favorezcan las síntesis del mismo. El medio de cultivo utilizado y los requerimientos nutricionales de la cepa empleada han demostrado afectar directamente la producción del polímero (Bajaj y Singhal, 2011; Luo *et al.*, 2016).

En la mayoría de los trabajos realizados para la optimización de la producción del PGA se utiliza principalmente el medio E (Leonard *et al.*, 1958) o derivados de este, que contiene altas concentraciones de fuentes de carbono: glicerol (80 g/L), ácido cítrico (12 g/L) y ácido glutámico (20 g/L), que permite obtener altas concentraciones de PGA (20 – 30 g/L). Lo anterior se debe a que el exceso de la fuente de carbono genera una represión catabólica por carbono que regula negativamente el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, dirigiendo el flujo de carbono hacia la síntesis de α -cetoglutarato (Wilming *et al.*, 2013), el cual es precursor del PGA (Troy, 1973).

La adición de ácido glutámico en cultivos desarrollados con cepas de *Bacillus* dependientes de glutamato ha mostrado favorecer la producción del polímero, alcanzando altas producciones volumétricas de PGA de más de 100 g/L, como puede apreciarse en la Tabla 1.2, en comparación de cultivos realizados con cepas de *Bacillus* independientes de glutamato, en donde la producción de PGA se encuentra alrededor de los 30 g/L (Tabla 1.3). Sin embargo, el uso del precursor incrementa significativamente los costos de producción en comparación con cultivos desarrollados con cepas no dependientes de glutamato, que representan un bajo costo de producción de PGA, lo que se convierte en un modelo atractivo para la producción industrial de este polímero.

Tabla 1.2. Producción de PGA en cultivos realizados con cepas de *Bacillus* cuya biosíntesis de PGA es dependiente de glutamato.

Cepa empleada	Componentes del medio de cultivo	PGA (g/L)
<i>B. subtilis</i> ZJU-7	Glucosa, L-glutamato, extracto de levadura, NaCl, CaCl ₂ , MgSO ₄ , MnSO ₄	101.1
<i>B. subtilis</i> NX-2	Glutamato, (NH ₄) ₂ SO ₄ , K ₂ HPO ₄ , MgSO ₄ , MnSO ₄ , paja de arroz hidrolizada	73.0
<i>B. subtilis</i> MJ80	Ácido glutámico, almidón, urea, ácido cítrico, glicerol, NaCl, K ₂ HPO ₄ , MgSO ₄ , MnSO ₄	68.7
<i>B. subtilis</i> NX-2	Melaza de caña, desechos de licor de glutamato monosódico	52.1
<i>B. licheniformis</i> P-104	Glucosa, glutamato de sodio, citrato de sodio, (NH ₄) ₂ SO ₄ , K ₂ HPO ₄ , MnSO ₄ , MnSO ₄	41.6
<i>B. licheniformis</i> NCIM 2324	Glicerol, ácido L-glutámico, ácido cítrico, (NH ₄) ₂ SO ₄ , K ₂ HPO ₄ , MgSO ₄ , MnSO ₄	35.75
<i>B. methylotrophicus</i> SK19.001	Glucosa, extracto de levadura, MgSO ₄ , K ₂ HPO ₄ , MnSO ₄	35.34
<i>B. subtilis</i> HB-1	Glutamato, extracto de levadura, NaCl, MgSO ₄ , xilosa	28.15
<i>B. licheniformis</i> TISTR 1010	Glucosa, ácido cítrico, NH ₄ Cl, K ₂ HPO ₄ , MgSO ₄ , CaCl, MnSO ₄ , NaCl, tween-80	27.5

Modificado de Luo *et al.* (2016).

Tabla 1.3. Producción de PGA en cultivos realizados con cepas de *Bacillus* cuya biosíntesis de PGA es independiente de glutamato.

Cepa empleada	Componentes del medio de cultivo	PGA (g/L)
<i>B. subtilis</i> C1	Glicerol, ácido cítrico, NH ₄ Cl	21.4
<i>B. licheniformis</i> SAB-26	Glucosa, glicerol, (NH ₄) ₂ SO ₄	33.5
<i>B. licheniformis</i> A13	Glucosa, NH ₄ Cl, extracto de levadura	28.2
<i>B. velezensis</i> NRRL B-23189	Melaza, ácido cítrico, (NH ₄) ₂ SO ₄	4.82
<i>B. subtilis</i> C10	Glucosa, NH ₄ Cl	27.7
<i>B. licheniformis</i> TISTR 1010	Glucosa, ácido cítrico, NH ₄ Cl	27.5
<i>B. methylotrophicus</i> SK 19.001	Glicerol, citrato de sodio, peptona	35.3
<i>B. licheniformis</i> TISTR 1010	Glucosa, ácido cítrico, NH ₄ Cl	39.9

Modificado de Sirisansaneeyakul *et al.* (2017).

1.6 Efecto de las condiciones de cultivo sobre la producción y el peso molecular del PGA

La producción, así como el peso molecular del PGA dependen de los parámetros físicos y químicos en los que se desarrolla un cultivo. Cromwick *et al.* (1996) evaluaron el efecto de la agitación y la aireación en la producción y el peso molecular del PGA, en un medio enriquecido con glutamato. Los autores observaron que a baja agitación (250 rpm) y baja aireación (0.5 L/min) se alcanzaron producciones de PGA de 14.2 g/L; mientras que, al incrementar estos dos parámetros (800 rpm y 2 L/min), la producción de PGA aumentó a 23 g/L. De forma similar, Bajaj y Singhal (2010) evaluaron el efecto de la aireación y la agitación sobre la producción y el peso molecular del PGA en cultivos en lote de *Bacillus licheniformis*. Los autores reportaron que las mayores producciones de PGA (46.3 y 43 g/L) se obtuvieron a una velocidad de agitación de 750 rpm con una aireación de 1 y 2 vvm, respectivamente. Sin embargo, al incrementar ambos parámetros a 1 000 rpm con 1 vvm y 750 rpm con 3 vvm, la producción de PGA disminuyó a 22.2 y 25.9 g/L, respectivamente, lo que sugiere la existencia de un límite en la relación entre el incremento de estos dos parámetros y el aumento en la producción de PGA. Respecto al peso molecular, los autores reportaron que fue alto al inicio del cultivo y disminuyó a lo largo del tiempo. La velocidad y el grado en la disminución del peso molecular del PGA en función del tiempo, fue más grande en condiciones de alta aireación y agitación, respecto a la baja aireación y agitación.

Conociendo las condiciones de operación y las características del reactor empleado, fue posible realizar el cálculo teórico de la VTO para conocer su efecto sobre la producción y el peso molecular del PGA (Figura 1.3) producido por *B. licheniformis* con base en los datos reportados por Bajaj y Singhal (2010). Se observó que tanto la concentración, así como el peso molecular del PGA aumentaron al incrementarse la VTO, hasta un máximo, después del cual ambos parámetros disminuyeron, indicando que existe una región de VTO alrededor de los 20 mmol/L h en la que se obtienen los máximos valores para ambos parámetros.

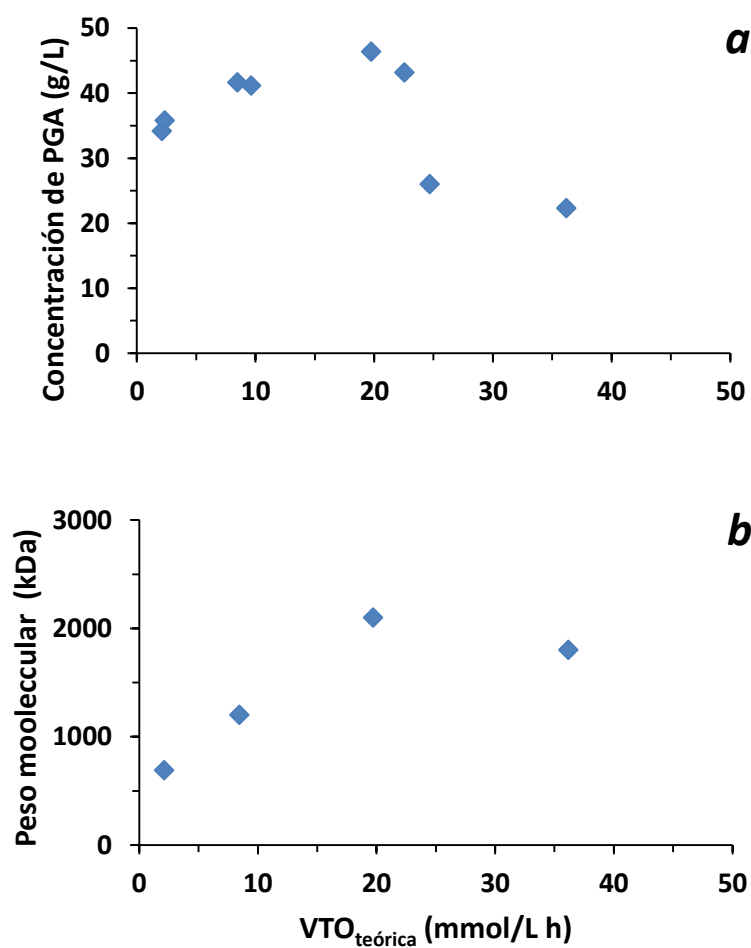


Figura 1.3. Efecto de la VTO teórica sobre a) la producción y b) el peso molecular del PGA producido por *Bacillus licheniformis* NCIM 2324. Cálculos realizados a partir de los resultados y condiciones de operación y características del reactor reportados por Bajaj y Singhal (2010).

1.7 Efecto del PGA sobre la viscosidad del caldo de cultivo

La producción del polímero genera un incremento en la viscosidad del caldo, este incremento depende de la concentración y del peso molecular del PGA.

Estudios realizados por Richard y Margaritis (2003) y Bajaj y Singhal (2010) muestran que el aumento en la producción de PGA incrementa la viscosidad del caldo de cultivo; sin embargo, los autores reportaron que no existe una relación clara entre la concentración del PGA y los cambios en la viscosidad del caldo, por lo que las características reológicas del caldo las atribuyeron al peso molecular del polímero. Lo anterior concuerda con lo reportado por Meissner *et al.* (2017), quienes determinaron que la viscosidad del caldo de cultivo se ve principalmente influenciada por el peso molecular del PGA, que por la concentración del polímero. Lo último, es un aspecto a considerar, ya que en algunos trabajos, el incremento en la viscosidad del caldo, se ha atribuido a la producción del PGA (Wilming *et al.*, 2013; Meissner *et al.*, 2015).

Wilming *et al.* (2013) realizaron cultivos de *Bacillus licheniformis* en matraces a diferentes velocidades de agitación y empleando diferentes volúmenes de llenado, con el objetivo de evaluar el efecto de la VTO sobre la viscosidad del caldo de cultivo. Como se puede observar en la Figura 1.4, existió una región de transferencia de oxígeno entre los 20 y los 40 mmol/L h en donde los caldos generados presentaron la mayor viscosidad (entre 50 y 60 mPa s, viscosidad medida a una velocidad de deformación $\dot{\gamma}=300 \text{ s}^{-1}$) y en condiciones de transferencia de oxígeno mayores a 40 mmol/L h, la viscosidad disminuyó hasta 22 mPa s. Los autores sugieren que la disminución de la disponibilidad de oxígeno favorece el incremento en la viscosidad del caldo, lo que concuerda con lo reportado por Meissner *et al.* (2015), quienes evaluaron el efecto de la disponibilidad de oxígeno sobre la viscosidad del caldo y observaron que en condiciones de limitación de oxígeno (19 mmol/L h) la viscosidad se incrementó hasta 12 mPa s, respecto de condiciones de no limitación de oxígeno ($\approx 50 \text{ mmol/L h}$), en donde no se observó incremento en la viscosidad del caldo. Es importante mencionar que en los trabajos mencionados, no se evaluó la producción ni el peso molecular de PGA y el incremento en la viscosidad se atribuyó a la producción del PGA.

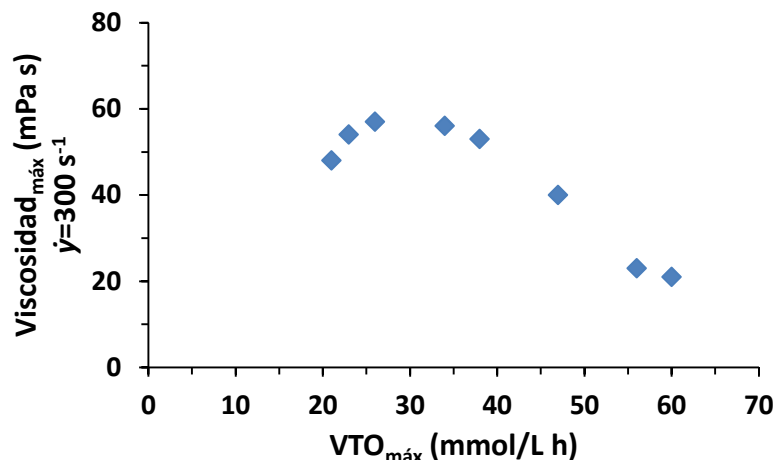


Figura 1.4. Relación de la VTO sobre la viscosidad del caldo de cultivo de cultivos de *Bacillus licheniformis* en matraces agitados. Adaptado de Wilming *et al.*, 2013.

Además, se sabe que el incremento de la concentración del PGA en el caldo, le confiere un comportamiento reológico no newtoniano, específicamente, un comportamiento pseudoplástico (Richard y Margaritis, 2003), en el cual, la viscosidad del caldo disminuye conforme aumenta la velocidad de deformación.

Es importante mencionar, que la mayoría de los trabajos reportados en la literatura, se han realizado con cepas de *B. subtilis* y *B. licheniformis*. En nuestro grupo de investigación, uno de los modelos biológicos con los que se trabaja es *B. velezensis* 83 para su aplicación como agente de control biológico y con el cual, en diferentes trabajos realizados en fermentador enfocados a optimizar la producción de esporas viables, se ha observado un incremento en la viscosidad del caldo y se ha confirmado la presencia del operón *pgs* (responsable de la producción del polímero) en el genoma de la bacteria. Por lo que se ha inferido que estos cambios en la viscosidad son debidos a la producción del PGA. Sin embargo, hasta antes del presente proyecto, ni la producción, ni el peso molecular del PGA han sido evaluados, por lo que surge el interés de conocer cómo la velocidad de transferencia de oxígeno impacta la producción y el peso molecular del PGA, y a su vez conocer la influencia que éstos tienen sobre la viscosidad del caldo. Asimismo, determinar cómo la viscosidad influye en el consumo de potencia. Por ello, se realizaron cultivos de *B. velezensis* 83 en matraces, a diferentes velocidades de agitación y volúmenes de llenado para generar diferentes velocidades de transferencia de oxígeno, y con ello conocer el impacto de la VTO y la P/V sobre el crecimiento de la bacteria y sobre la producción y el peso molecular del PGA.

1.8 Producción de acetoína y 2,3-butanodiol

Una de las características de la oxidación de carbohidratos como fuente de carbono, es la formación de múltiples subproductos, tal es el caso de la acetoína y el 2,3-butanodiol, que son sintetizados a partir del piruvato proveniente de la glucólisis. En adición a esto, el ácido acético puede ser formado por conversión de la acetoína a acetato (forma ionizada del ácido acético).

La función metabólica atribuida a la producción de éstos compuestos reside en evitar la acumulación de acetato y la subsecuente acidificación intracelular por mantenimiento del poder reductor, debido a la conversión reversible de acetoína a 2,3-butanodiol en donde el NAP^+ es reducido a NAPH_2 (Magee y Kosaric, 1987; Celinska y Grajek, 2009).

Por lo anterior, la producción de 2,3-butanodiol está fuertemente influenciada por la disponibilidad de oxígeno, siendo las condiciones de baja transferencia de oxígeno las que favorecen la producción de este metabolito (Alam *et al.*, 1990; Celinska y Grajek, 2009).

La acetoína y el 2,3-butanodiol son producidos principalmente durante la fase de crecimiento exponencial (Biswas *et al.*, 2012). Ambos productos también juegan un rol importante como reserva de carbono y energía para el mantenimiento celular durante la fase estacionaria en donde las principales fuentes de carbono y energía han sido agotadas (Celinska y Grajek, 2009).

Las principales bacterias productoras de estos compuestos, pertenecen a los géneros *Klebsiela*, *Serratia*, *Pseudomonas* y *Bacillus* (Magee y Kosaric, 1987). Las bacterias de éste último grupo, producen 2,3-butanodiol como mayor producto derivado del metabolismo de carbohidratos, por ésta razón, tanto el 2,3-butanodiol y su precursor, la acetoína, generalmente se asocian al crecimiento celular (Megee y Kosaric, 1987).

Cristiano (2012) realizó cultivos en lote alimentado de *B. amyloliquefaciens* 83, (ahora denominada *B. velezensis* 83) con sobreflujo de carbono (180 g de glucosa por litro) y observó producciones de acetoína y 2,3-butanodiol de 50.6 y 3.2 g/L, respectivamente. Por su parte, concentraciones de glucosa de 15 g/L, produjeron 1.5 y 2.2 g/L de acetoína y 2,3-butanodiol, respectivamente (Soriano, 2016). Por lo anterior, la producción de estos metabolitos puede ser utilizada como indicador del flujo de carbono en la célula.

CAPÍTULO 2

2. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La Figura 2.1 esquematiza el diagrama general de la estrategia experimental que se siguió para el desarrollo del presente proyecto. La velocidad de transferencia de oxígeno se modificó en función de cambios en la velocidad de agitación y en el volumen de llenado de los matraces. Para ello se utilizaron matraces de 250 mL, agitados a 100 y 200 rpm con 50 mL de V_{Llenado} , y 200 y 250 rpm con 15 mL de V_{Llenado} . Los cultivos se realizaron a 30 °C y con un diámetro de agitación de 2.5 cm.

Los experimentos se llevaron a cabo en dos partes de forma paralela. Se realizaron mediciones en línea de la velocidad de transferencia de oxígeno en el equipo RAMOS por sus siglas en inglés (Respiration Activity Monitoring System), (Anderlei y Büchs, 2001) y del consumo de potencia en el equipo desarrollado por Büchs *et al.* (2000 a y b) e implementado en nuestro laboratorio por Pliego (2014). Se realizaron cultivos en paralelo bajo las mismas condiciones en una incubadora orbital, para realizar muestreos del cultivo con el objetivo de evaluar el crecimiento celular, la producción y el peso molecular del PGA, así como el consumo de sustrato (carbono y nitrógeno) y la producción de acetoína, 2,3-butanodiol y ácido acético. También se realizó la caracterización reológica del caldo de cultivo, a partir de donde se determinó su viscosidad. Cada condición se evaluó por triplicado de procesos independientes.

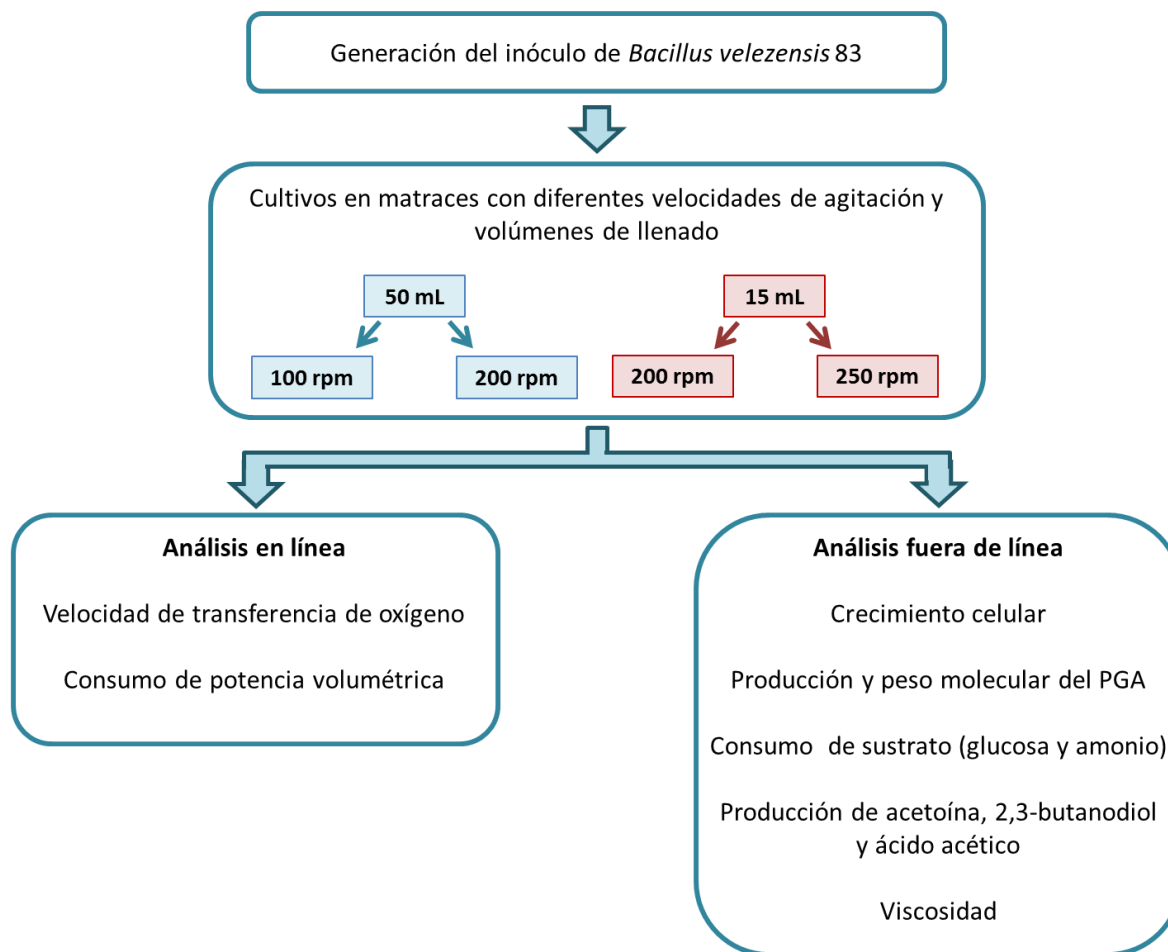


Figura 2.1. Esquema general de la estrategia experimental desarrollada en el presente trabajo.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Microorganismo

Se utilizó la cepa *Bacillus velezensis* 83 (anteriormente identificada como *B. amyloliquefaciens* 83) aislada de la filósfera de cultivos de mango y proporcionada por el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., Unidad Culiacán, Sinaloa.

3.1.1 Conservación de la cepa

La cepa se conservó en glicerol al 80 %, a una temperatura de -18 °C. La preparación de la suspensión celular en glicerol se realizó de la siguiente manera. La bacteria se creció en un matraz de 250 mL con 50 mL de medio mineral (Tabla 3.1) a 200 rpm y 30 °C por 24 horas. El caldo de cultivo se mezcló, en condiciones estériles, con una suspensión acuosa de glicerol al 80 % (p/v), en una relación 1:1 (suspensión celular: glicerol).

3.2 Medios de cultivo

3.2.1 Medio mineral

La composición del medio mineral se muestra en la Tabla 3.1. En el medio mineral utilizado para la conservación de la cepa y el desarrollo del inóculo, la concentración de glucosa fue de 10 g/L. Para el desarrollo de las evaluaciones del proceso, la concentración de glucosa en el medio fue de 15 g/L.

Tabla 3.1. Composición del medio mineral.

Componente	Concentración (g/L)
Glucosa	15
(NH ₄) ₂ SO ₄	4
K ₂ HPO ₄	5.32
KH ₂ PO ₄	6.4
MgSO ₄ – 7H ₂ O	0.4
MnCl ₂	0.005
CaCl ₂	0.04
FeSO ₄ – 7H ₂ O	0.03

Para la elaboración del medio mineral, primero se preparó la solución de fosfatos (K_2HPO_4 y KH_2PO_4) y sulfato de amonio, a la cual se le ajustó el pH a 7.2 con NaOH 2 N, y se esterilizó a 121 °C por 20 min. De forma individual, se disolvieron y esterizaron la glucosa y las sales restantes, las cuales, en condiciones estériles, se adicionaron a la solución de amonio y fosfatos.

3.2.2 Medio YPG (por sus siglas en inglés: Yeast, Peptone, Glucose)

En la Tabla 3.2 se muestra la composición del medio YPG (el pH del medio es de 7.0, por lo que no es necesario ajustar el pH).

Tabla 3.2. Composición del medio YPG.

Componente	Concentración (g/L)
Extracto de levadura	10
Peptona	10
Glucosa	10
Agar (sólo para medio sólido)	15

3.3 Cultivos en matraces agitados

3.3.1 Condiciones de cultivo para la evaluación de la velocidad de transferencia de oxígeno y el consumo de potencia

La velocidad de transferencia de oxígeno se modificó en función de cambios en el volumen de llenado y la velocidad de agitación. Por ello, para generar un amplio rango de VTO se utilizaron dos volúmenes de llenado (50 y 15 mL) y tres velocidades de agitación (100, 200 y 250 rpm), de acuerdo a la Tabla 3.3. Los cultivos se desarrollaron a 30 °C y con un diámetro de agitación de 2.5 cm. El proceso descrito se realizó por triplicado.

Tabla 3.3. Condiciones de operación del cultivo para generar diferentes velocidades de transferencia de oxígeno.

Volumen de llenado (mL)	Agitación (rpm)
50	100
	200
15	200
	250

3.3.2 Sistemas de medición de velocidad de transferencia de oxígeno y consumo de potencia

3.3.2.1 Sistema de monitoreo de actividad respiratoria en línea

La actividad respiratoria de *B. velezensis* 83 se determinó mediante el empleo del sistema de monitoreo de actividad respiratoria en línea (RAMOS por sus siglas en inglés), diseñado por Anderlei y Büchs (2001). En la Figura 3.1 se muestra una vista general del equipo RAMOS (H/Tec Zang, Alemania) y los aditamentos del matraz (Figura 3.1b).

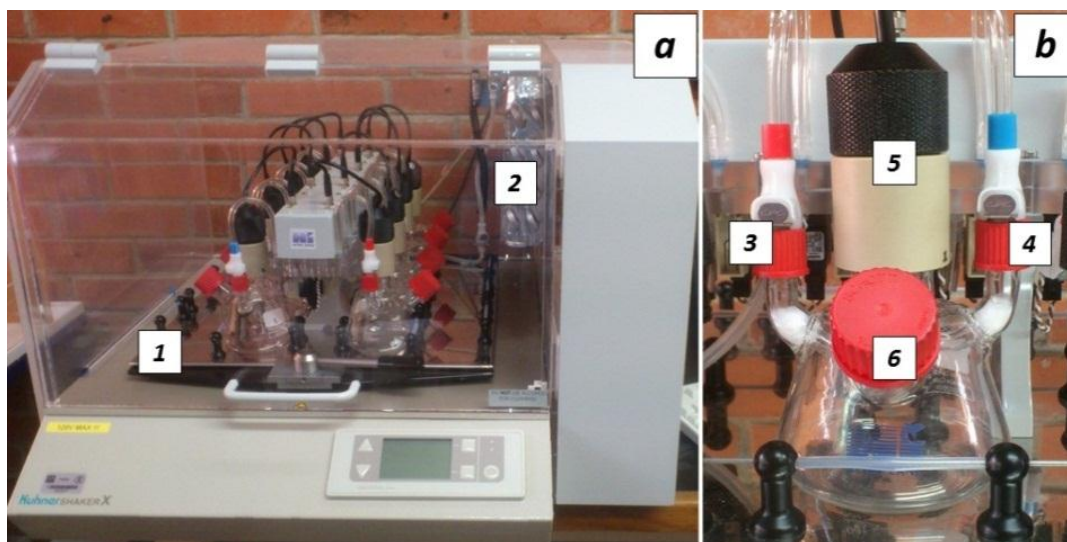


Figura 3.1. Sistema de monitoreo de actividad respiratoria en línea (RAMOS). En *a*) se muestra una vista general del equipo que consta de una plataforma de agitación (1) y un controlador de temperatura (2). En *b*) se muestran los aditamentos del matraz que son una válvula de entrada y salida de aire (3 y 4, respectivamente), un sensor de oxígeno (5) y un puerto de inoculación (6).

El principio de medición del equipo RAMOS se basa en la repetición de un ciclo que consiste en una fase de medición (10 minutos), una fase de aireación (20 minutos) y una calibración automática (para ajustar la desviación en los sensores de oxígeno), que se repite durante todo el proceso de fermentación (Figura 3.2). Durante la fase de medición, las válvulas de entrada y salida de gas, son cerradas. La actividad respiratoria de los microorganismos conduce a una disminución de la presión parcial de oxígeno y a un incremento en la presión parcial de CO₂ en la parte superior del matraz.

En la fase de aireación, que inicia con la apertura de las válvulas para evitar el agotamiento de oxígeno, los matraces son alimentados con aire a un flujo de 10 mL/min con un contenido de oxígeno de 20.95 % (Anderlei y Büchs, 2001).

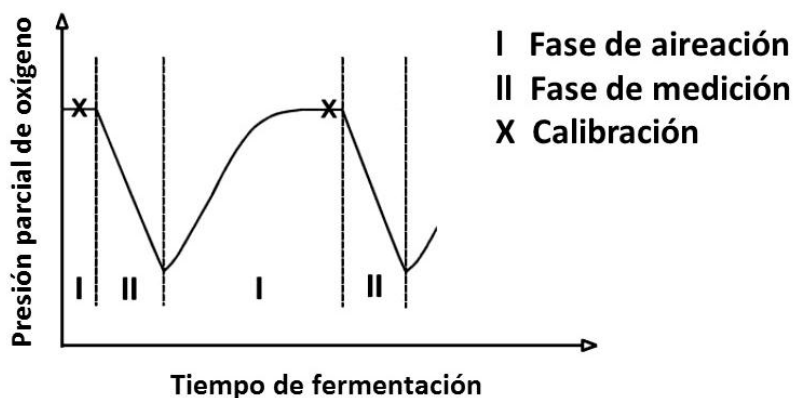


Figura 3.2. Presión parcial de oxígeno durante un ciclo de medición de la VTO en el sistema RAMOS. (Tomado de Anderlei y Büchs, 2001)

La VTO y la VCO₂ (velocidad de producción de CO₂) son calculadas a través de la pendiente del cambio en la presión parcial de ambos gases, de acuerdo con las siguientes ecuaciones:

$$VTO = \frac{n_{O_2}}{V_{Llenado} \cdot t} = \frac{\Delta p_{O_2}}{\Delta t} = \frac{V_g}{R \cdot T \cdot V_{Llenado}} \quad (\text{ec. 6})$$

$$VCO_2 = \frac{n_{CO_2}}{V_{Llenado} \cdot t} = \frac{\Delta p_{CO_2}}{\Delta t} = \frac{V_g}{R \cdot T \cdot V_{Llenado}} \quad (\text{ec. 7})$$

donde n_{O_2} y n_{CO_2} son los moles de O_2 y CO_2 , respectivamente, $V_{Llenado}$ es el volumen de llenado (en L), t es el tiempo de cultivo (en h), Δp_{O_2} y Δp_{CO_2} son el cambio en la presión parcial del oxígeno y CO_2 en la parte superior del matraz (en bar), respectivamente, Δt es el tiempo de la fase de medición (en h), V_G es el volumen del gas (en L), R es la constante de los gases (en bar L/mol K) y T es la temperatura (en °K).

El coeficiente de respiración (CR) se obtiene mediante la siguiente ecuación:

$$CR = \frac{V_{CO_2}}{V_{CO}} \quad (\text{ec. 8})$$

3.3.2.2 Equipo de medición de consumo de potencia

El consumo de potencia volumétrica (P/V) se determinó mediante el empleo del equipo de medición de potencia en línea desarrollado por Büchs *et al.* (2000 a y b) e implementado y validado dentro de nuestro laboratorio por Pliego (2014).

Los componentes del equipo de medición de potencia en línea se muestran en la Figura 3.3. El consumo de potencia volumétrica en matraces agitados se estima a través de la frecuencia de agitación y el torque generado por el equipo, utilizando la ecuación 9, de acuerdo con el método propuesto por Büchs *et al.* (2000 a y b), que consiste en obtener el torque generado por el equipo y una compensación por las pérdidas por fricción. Un sensor de torque convierte la deformación elástica en una señal de salida de voltaje, la cual es registrada por una computadora de escritorio. La ecuación 9 se describe como sigue:

$$\frac{P}{V} = \frac{(M_1 - M_2) \cdot 2 \cdot \pi \cdot n}{z \cdot V_{Llenado}} \quad (\text{ec. 9})$$

donde $(M_1 - M_2)$ es la diferencia del torque de la plataforma agitadora (en N m) medido con medio líquido (M_1) y medio sólido (M_2), que representa una compensación por las pérdidas por fricción del

líquido en movimiento, $2 \cdot \pi \cdot n$ es la velocidad angular (ω); donde n es la frecuencia de agitación (en s^{-1}). $V_{Llenado}$ es el volumen de llenado (en m^3) y z es el número de matraces sobre la plataforma.

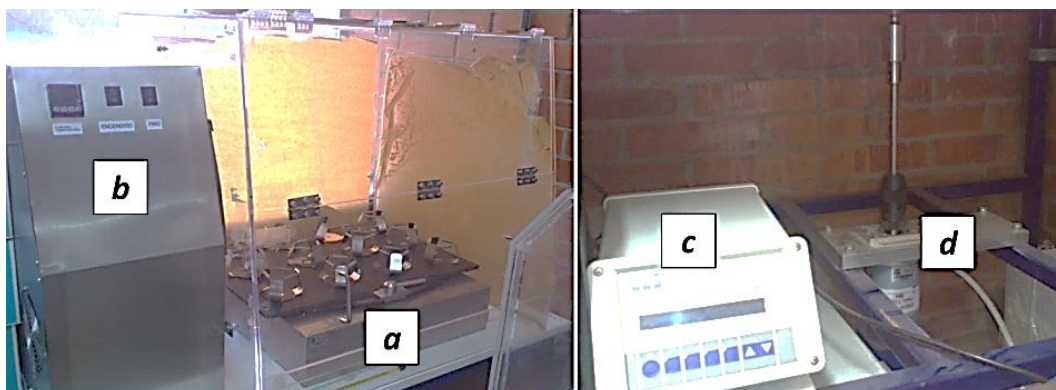


Figura 3.3. Equipo de medición de potencia en línea. a) Plataforma de agitación, b) control de temperatura, c) control de agitación y torque y d) sensor de torque (Pliego, 2014).

La medición del torque con medio sólido o torque de calibración de cada condición de agitación, así como de sus respectivos volúmenes de llenado, se realizaron con una solución de agar (25 g/L), la cual se esterilizó a 121 °C por 20 minutos; en condiciones estériles, se adicionó a matraces de 250 mL, manteniendo el mismo volumen y el mismo peso que los matraces con medio de cultivo. Los matraces con medio sólido para las calibraciones, se incubaron a las mismas condiciones de cultivo que los matraces con medio líquido.

Los valores promedio de torque de calibración para cada condición evaluada y sus desviaciones estándar se presentan en el Anexo 1.

3.3.3 Desarrollo del inóculo para los cultivos en matraces agitados para la evaluación de la VTO y la P/V

El desarrollo del inóculo se realizó en tres etapas. En la primera etapa (activación de la cepa), se tomaron tres asadas de la cepa conservada en glicerol y se estiraron en una caja Petri con medio YPG sólido, la caja Petri se incubó a 30 °C por 24 horas.

En la segunda etapa, se tomaron dos azadas de las colonias formadas en la caja Petri (primera etapa), las cuales se resuspendieron en un tubo de ensayo con 5 mL de medio YPG; el tubo se incubó a 200 rpm a 30 °C por 12 horas.

En la tercera etapa, desarrollada en matraces de 250 mL, se eliminó el sobrenadante del cultivo en tubo, para ello, las células se centrifugaron a 12 000 rpm a 5 °C por 15 minutos; el paquete celular se resuspendió en 50 mL de medio mineral (ver Tabla 3.1) en un matraz Erlenmeyer de 250 mL. El matraz se incubó a 200 rpm a 30 °C por 12 horas.

Se tomaron 8 mL de caldo del matraz de 250 mL (etapa 3) y se centrifugó a 12 000 rpm a 5 °C por 15 minutos, el paquete celular se resuspendió en solución salina al 0.9 % y se aforó a 8 mL. En esta solución celular se realizó el conteo celular en cámara de Neubauer y en el microscopio utilizando el objetivo 40x.

Los matraces en los que se evaluaron la VTO, la P/V y los parámetros cinéticos, se inocularon con una concentración celular de $7 \times 10^7 \pm 1.0 \times 10^7$ cel/mL. Los cultivos se desarrollaron a 30 °C y utilizando el volumen de llenado y velocidad de agitación correspondiente a cada proceso a evaluar. Cada proceso se evaluó por triplicado de experimentos independientes.

El tiempo de duración de cada cultivo, se determinó con base en los perfiles de VTO obtenidos por el equipo RAMOS. Para los cultivos desarrollados a 100 y 200 rpm con 50 mL de V_{Llenado} el tiempo de cultivo fue de 48 horas, mientras que para los cultivos desarrollados a 200 y 250 rpm con 15 mL de V_{Llenado} fue de 24 horas. Para la determinación de la acetoína, el 2,3-butanodiol y el ácido acético, el tiempo de cultivo para la condición desarrollada a 100 rpm con 50 mL de V_{Llenado} se extendió hasta las 72 horas.

La toma de muestras para cada una de las fases de la cinética celular se realizó de la siguiente forma:

- fase de adaptación: cada cuatro horas
- fase exponencial de crecimiento: cada dos horas
- fase estacionaria: de cuatro a seis horas

3.4 Técnicas Analíticas

3.4.1 Conteo celular

Se realizó una cuenta total en cámara de Neubauer (sin distinguir entre células viables y no viables, células vegetativas y esporas) de acuerdo al método reportado por Cristiano (2012).

En la Figura 3.4, se presenta la cuadrícula de una cámara de Neubauer. En el centro de la cuadrícula de la cámara, se encuentra un cuadro conformado por 25 cuadrados con lados de 0.20 mm de longitud, con un área de 0.04 mm^2 (cuadrado encerrado en el círculo). A su vez, cada uno de estos cuadrados está dividido en 16 cuadrados de 0.02 mm de longitud. La profundidad de la cámara es de 0.1 mm. Debido al tamaño de la bacteria, conviene trabajar sobre los cuadrados de 0.04 mm^2 de superficie (señalados con el círculo), de esta forma, se tiene un volumen de 0.004 mm^3 , equivalente a $4 \times 10^{-6} \text{ mL}$.

Se colocaron $30 \mu\text{L}$ de muestra sobre la cámara de Neubauer y se observó al microscópio con el objetivo 40x. Se contaron las células de 4 cuadrantes y se obtuvo el promedio correspondiente. La concentración celular, se obtiene mediante la ecuación 10.

$$\frac{\text{cel}}{\text{mL}} = \frac{\text{promedio de células contadas}}{4 \times 10^{-6} \text{ mL}} \cdot \text{factor de dilución} \quad (\text{ec. 10})$$

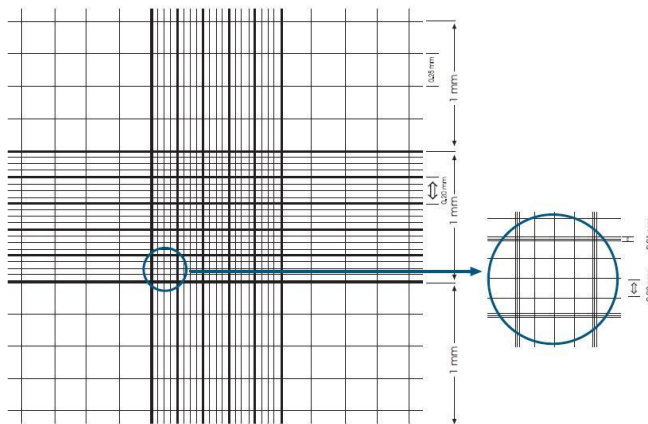


Figura 3.4. Cuadrícula de una cámara de Neubauer. El círculo señala el cuadrante en que se contaron las células de *Bacillus velezensis* 83.

3.4.2 Determinación de proteína

La proteína se determinó por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951), el cual es un método colorimétrico, siendo la intensidad de la coloración proporcional a la concentración de proteína. Durante la reacción se forma un complejo Cu^{+2} -proteína, entre los iones Cu^{+2} de la solución reactiva y

el nitrógeno de los enlaces peptídicos de la proteína, y exponiendo los residuos fenólicos de tirosina, los cuales reducen al ácido túngstico del reactivo Folin.

Se preparó una solución A (conformada por Na_2CO_3 al 2 % en NaOH 0.1 N), una solución B (conformada por tartrato de Na y K al 2%) y una solución C (conformada por CuSO_4 al 1%), con las cuales se preparó una solución reactiva (1% de solución C, 1 % de solución B y 98 % de solución A). La solución reactiva se preparó al momento de su uso.

Curva de calibración

Se preparó una curva de calibración con estándares de albúmina bovina (SIGMA) de acuerdo a las siguientes concentraciones: 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 g/L.

Para el procesamiento de la curva de calibración se procedió de la siguiente manera:

- En un tubo de 1.5 mL se colocaron 200 μL de estándar y 1 mL de solución reactiva (recién preparada), se agitó en un vórtex y se dejó reposar por 10 minutos.
- Se adicionaron 100 μL de reactivo Folin y fenol de Ciocalteu y se agitó en vórtex. Se dejó reaccionar en oscuridad por 30 minutos. Posteriormente, se centrifugó a 11 000 rpm por 2 minutos.
- La absorbancia se determinó a una longitud de onda de 625 nm en un espectrofotómetro (Genesys 10s UV-VIS).
- Para la elaboración del blanco, se utilizó agua desionizada y se procesó de la misma manera en que se procesaron los estándares.

La ecuación de la curva para la determinación de proteína fue:

$$\text{Proteína} \left(\frac{\text{g}}{\text{L}} \right) = \frac{\text{absorbancia}_{625 \text{ nm}} - 0.0356}{1.281} \quad (\text{ec. 11})$$

Donde 1.281 es la pendiente de la recta y 0.0356 es la ordenada al origen. $R^2 = 0.997$.

Procesamiento de las muestras

- Se tomaron 500 μL de la muestra y se centrifugó a 12 000 rpm por 15 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en 500 μL de agua desionizada.
- El procesamiento de las muestras se realizó de la misma forma en que se procesaron los estándares.

3.4.3 Glucosa residual

La glucosa residual se determinó en el caldo de cultivo libre de células por el método de DNS y por YSI, debido a que hacia finales del cultivo, la producción de PGA causa interferencia en las mediciones obtenidas por el método de DNS.

3.4.3.1 Glucosa residual por DNS

Es una técnica colorimétrica que determina la presencia de grupos carbónicos libres de los azúcares reductores, a través de una reacción redox entre el ácido 3,5-dinitrosalicílico y los azúcares reductores, dando como producto al ácido 3-amino, 5-nitrosalicílico que provoca una coloración marrón oscuro cuya intensidad es proporcional a la cantidad de azúcares reductores.

Curva de calibración

Se preparó una curva de calibración con estándares de glucosa de acuerdo a las siguientes concentraciones: 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 g/L.

Para el procesamiento de la curva de calibración se procedió de la siguiente manera:

- En un tubo de 1.5 mL se colocaron 100 μL de estándar y 100 μL de DNS y se agitó en vórtex.
- El tubo se sumergió en baño María en ebullición por 5 minutos e inmediatamente después se colocó en hielo para detener la reacción.
- Se agregó 1 mL de agua desionizada y se agitó en vórtex.
- La absorbancia se midió a una longitud de onda de 540 nm en un espectrofotómetro (Genesys 10s UV-VIS).

- Para la elaboración del blanco, se utilizó agua desionizada y se procesó de la misma manera en que se procesaron los estándares.

La ecuación de la curva para la determinación de glucosa fue:

$$\text{Glucosa} \left(\frac{g}{L} \right) = \frac{\text{Absorbancia}_{540 \text{ nm}} + 0.0229}{0.551} \quad (\text{ec. 12})$$

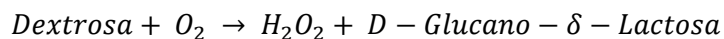
donde 0.551 es la pendiente de la recta y 0.0229 es la ordenada al origen. $R^2 = 0.999$.

Procesamiento de las muestras

- La glucosa residual se midió en el caldo de cultivo libre de células, por lo que las muestras se centrifugaron a 12 000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente y se recuperó el sobrenadante.
- El procesamiento del sobrenadante se realizó de la misma forma en que se procesaron los estándares.

3.4.3.2 Glucosa residual por YSI

El método por YSI (analizador *Yellow Spring Instruments*), se basa en la oxidación de la glucosa por la enzima glucosa-oxidasa, la cual se encuentra inmovilizada en el sensor, dando como producto peróxido de hidrógeno, mediante la siguiente reacción:



El peróxido de hidrógeno es electroquímicamente oxidado en el ánodo de platino de la sonda, la cual produce una señal eléctrica, que es registrada por el equipo, y es proporcional a la concentración de glucosa.

La glucosa residual se midió en el caldo de cultivo libre de células, por lo que las muestras se centrifugaron a 12 000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente y se recuperó el sobrenadante.

3.4.4 Amonio residual

El amonio residual se cuantificó en el caldo de cultivo libre de células con el método colorimétrico de Indofenol de acuerdo a lo reportado por Cristiano (2012), en el cual el amonio reacciona con el hipoclorito de sodio para formar cloramina, la cual reacciona con el fenol, formándose el cromógeno p-hidroxifeniliminobenzoquinona, el cual es proporcional a la cantidad de amonio presente en el medio.

Se preparó una solución A (conformada por fenol 0.106 M y nitroferrocianuro de sodio 0.17 mM) y una solución B (conformada por hidróxido de sodio 0.125 N e hipoclorito de sodio 11 mM).

Curva de calibración

Se preparó una curva de calibración con estándares de sulfato de amonio, de acuerdo a las siguientes concentraciones: 0.05, 1, 2, 4, 6, 8 y 10 mM.

Para el procesamiento de la curva de calibración se procedió de la siguiente manera:

- En un tubo de 2 mL se colocó 1 mL de solución A, posteriormente se adicionaron 25 μ L de estándar y se agitó en vórtex. Enseguida se adicionó 1 mL de solución B y se agitó nuevamente. Se dejó reaccionar por 30 minutos.
- La absorbancia se midió a una longitud de onda de 625 nm en un espectrofotómetro (Genesys 10s UV-VIS).
- Para la elaboración del blanco, se utilizó agua desionizada y se procesó de la misma manera en que se procesaron los estándares.

La ecuación de la curva para la determinación de amonio fue:

$$\text{Amonio (mM)} = \frac{\text{Absorbancia}_{625 \text{ nm}} - 0.0162}{0.4832} \quad (\text{ec. 13})$$

donde 0.4832 es la pendiente de la recta y 0.0162 es la ordenada al origen. $R^2 = 998$.

Procesamiento de las muestras

El amonio residual se midió en el sobrenadante del caldo de cultivo libre de células, por lo que las muestras se centrifugaron a 12 000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente y se recuperó el sobrenadante.

- Para la determinación de la absorbancia de las muestras, se realizó una dilución con agua desionizada en una relación 1:10 (muestra/agua desionizada) y se midió a una longitud de onda de 625 nm en un espectrofotómetro (Genesys 10s UV-VIS).
- El procesamiento de las muestras se realizó de la misma forma en que se procesaron los estándares.

3.4.5 Determinación de la concentración de PGA

La concentración del PGA en el caldo de cultivo libre de células se determinó por cromatografía de permeación en gel (GPC, por sus siglas en inglés), usando una columna ultrahidrogel 500 y una columna lineal con precolumna, acopladas a un equipo de HPLC con un detector de índice de refracción (Waters 2414). Como fase móvil se utilizó nitrato de sodio 0.1 M a una temperatura de 38 °C con un flujo de 0.8 mL/min. El volumen inyectado de las muestras (caldo de cultivo libre de células) y de los estándares fue de 100 µL.

Se realizó una curva de calibración con estándares de ácido-L-γ-poliglutámico como sal de sodio (Sigma-Aldrich), de acuerdo a las siguientes concentraciones: 0.1, 0.4, 0.6 y 0.8 g/L.

La ecuación de la curva para la determinación de la concentración de PGA fue:

$$PGA \left(\frac{g}{L} \right) = \frac{\text{Área} + 16\,775}{684\,795} \quad (\text{ec. 14})$$

donde 684 795 es la pendiente de la recta y 16 775 es la ordenada al origen. $R^2 = 0.995$.

3.4.6 Determinación del peso molecular del PGA

El peso molecular del PGA en el caldo de cultivo libre de células se determinó por cromatografía de permeación en gel (GPC, por sus siglas en inglés), usando una columna ultrahidrogel 500 y una columna lineal con precolumna, acopladas a un equipo de HPLC con un detector de índice de refracción (Waters 2414). Como fase móvil se utilizó nitrato de sodio 0.1 M a una temperatura de 38 °C, con un flujo de 0.8 mL/min. El volumen de inyección de las muestras (caldo de cultivo libre de células) y de los estándares fue de 100 µL.

Se realizó una curva de calibración con estándares de óxido de polietileno (Waters), de acuerdo a los siguientes pesos moleculares: 24.2, 41.3, 70.9, 163, 311, 502 y 933 kDa.

3.4.7 Determinación de acetoína, 2,3-butanodiol y ácido acético

La concentración de ácido acético, 2,3-butanodiol y acetoína en el caldo de cultivo libre de células se determinó mediante HPLC de acuerdo a lo reportado por Soriano (2016). Se utilizó un módulo de separación Waters 2695 equipado con una columna para análisis de ácidos orgánicos Aminex HPX-87H (de 7.8x300 mm), empacada con una resina de estireno-divinilbenceno. La fase móvil fue ácido sulfúrico 5 mM, a un flujo de 0.6 mL/min y una temperatura de columna de 40 °C. El volumen de inyección de las muestras (caldo de cultivo libre de células) y de los estándares fue de 20 µL. La detección del ácido acético (Figura 3.5a) y el 2,3-butanodiol (Figura 3.5b) se realizó con un detector de índice de refracción (Waters 2414). La detección de la acetoína (Figura 3.5c) se realizó con un detector de arreglo de diodos (Waters 2996) con una longitud de onda de 210 nm.

Debido a que durante la detección de los compuestos en el detector de índice de refracción, la acetoína y el 2,3-butanodiol (y un isómero del 2,3-butanodiol), (Figura 3.5b) presentaron el mismo tiempo de retención, fue necesario realizar la corrección de la cuantificación de estos productos y no sobreestimar la concentración de 2,3-butanodiol en el cultivo. Para ello se determinó el área neta del 2,3-butanodiol (y su isómero) y se restó el área de la acetoína de la siguiente manera:

1. Se obtuvo el área de la acetoína en el detector de arreglo de diodos
2. Se determinó la concentración del área de la acetoína, por interpolación con la curva de calibración para la acetoína realizada en el detector de arreglo de diodos.

3. La concentración de acetoína se convirtió a área por interpolación con la curva de calibración del 2,3-butanodiol correspondiente al detector de índice de refracción (que fueron equivalentes).
4. El área resultante se restó del área del 2,3-butanodiol (y su isómero), para obtener el área neta correspondiente sólo del 2,3-butanodiol.
5. Se determinó la concentración del 2,3-butanodiol (y su isómero) por interpolación con la curva de calibración del 2,3-butanodiol realizada utilizando el detector de índice de refracción.

La ecuación de la curva para la determinación de la concentración de acetoína fue:

$$\text{Acetoína} \left(\frac{g}{L} \right) = \frac{\text{Área} - 32586}{734369} \quad (\text{ec. 15})$$

Donde 734369 es la pendiente de la recta y 32582 es la ordenada al origen. $R^2 = 0.999$.

La ecuación de la curva para la determinación de la concentración de 2,3-butanodiol fue:

$$2,3 - \text{butanodiol} \left(\frac{g}{L} \right) = \frac{\text{Área} + 1579}{116437} \quad (\text{ec. 16})$$

Donde 116437 es la pendiente de la recta y 1579 es la ordenada al origen. $R^2 = 0.999$.

La ecuación de la curva para la determinación de la concentración de ácido acético fue:

$$\text{Ácido acético} \left(\frac{g}{L} \right) = \frac{\text{Área} + 46888}{1111495} \quad (\text{ec. 17})$$

Donde 1111495 es la pendiente de la recta y 46888 es la ordenada al origen. $R^2 = 0.999$.

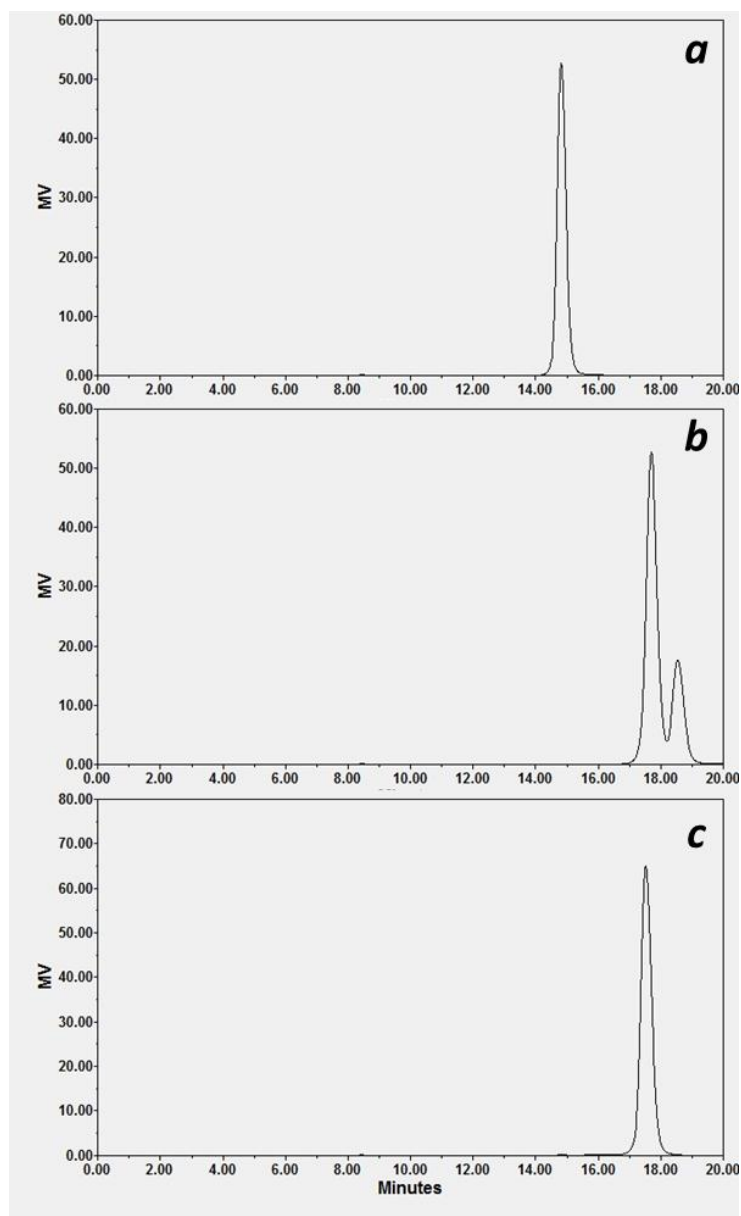


Figura 3.5. Cromatograma típico en HPLC de *a*) ácido acético y *b*) 2,3-butanodiol y un isómero del 2,3-butanodiol (utilizando un detector de índice de refracción, Waters 2414), y de *c*) acetoína (utilizando un detector de arreglo de diodos, Waters 2996, a una longitud de onda de 210 nm).

3.4.8 Determinación de la viscosidad del caldo de cultivo

El caldo de cultivo se separó de la células por centrifugación a 12 000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente.

La viscosidad del caldo de cultivo se determinó a través de ensayos reológicos con un reómetro AR 1000 (TA Instruments) con una geometría de cono y plato, de 60 mm de diámetro y un ángulo de 1°, en un rango de velocidad de deformación de 10 – 1 500 s⁻¹, y utilizando 1 mL de muestra a 30 °C. La viscosidad aparente se determinó empleando la ley de potencia (ecuación 18) y se reportó a una velocidad de deformación de 300 s⁻¹, debido a que esta es la velocidad de deformación que predomina dentro de un matraz agitado (Wilming *et al.*, 2013).

$$\eta = k\dot{\gamma}^m \quad (\text{ec. 18})$$

Donde η es la viscosidad aparente, $\dot{\gamma}$ es la velocidad de deformación, k es el índice de consistencia y m es el índice de flujo.

3.4.9 Análisis estadístico

El análisis estadístico para los máximos valores obtenidos en cada parámetro evaluado se realizó mediante la prueba de t de *student* con un nivel de confianza del 95 %, de acuerdo a lo descrito por Galindo (2013).

CAPÍTULO 3

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Crecimiento celular y velocidad de transferencia de oxígeno

En la Figura 4.1a se muestran los perfiles de velocidad de transferencia de oxígeno para las condiciones de cultivo evaluadas. En todas las condiciones, la VTO se incrementó exponencialmente a partir de las 8 horas de cultivo. Los cultivos agitados a 100 y 200 rpm con 50 mL de $V_{Llenado}$ mostraron limitación por oxígeno, evidenciada por una zona “plateau” (Anderlei y Büchs, 2001) desde las 12 y 14 horas de cultivo, respectivamente, alcanzando valores máximos de VTO de 2.5 ± 0.03 y 5.7 ± 0.13 mmol/L h, respectivamente. Por su parte, los cultivos agitados a 200 y 250 rpm con 15 mL de $V_{Llenado}$ mostraron perfiles similares y no se encontraron limitados por oxígeno, alcanzando una $VTO_{m\acute{a}x}$ de 17 ± 1.0 y 19 ± 0.6 mmol/L h a las 20 horas de cultivo, respectivamente. A partir de las 22 horas, para ambos cultivos, la VTO disminuyó rápidamente hasta aproximadamente 3 mmol/L h. Este comportamiento en los perfiles de VTO fue similar al reportado por Wilming *et al.* (2013) para cultivos de *B. licheniformis* en matraces con diferentes velocidades de agitación (350 – 400 rpm) y diferentes volúmenes de llenado (10 – 55 mL). Los autores reportaron que la VTO aumentó exponencialmente, alcanzando sus máximos valores entre los 45 y 60 mmol/L h, alrededor de las 16 horas de cultivo, posteriormente, la VTO disminuyó rápidamente a 5 mmol/L h, a las 18 horas de cultivo.

El análisis estadístico demostró que los máximos valores de VTO alcanzados para cada condición, son diferentes; excepto entre las condiciones desarrolladas a 200 y 250 rpm con 15 mL de $V_{Llenado}$, donde no se observaron diferencias significativas. De acuerdo a lo anterior y a los valores de VTO alcanzados para cada cultivo, es posible referirse a los cultivos agitados a 100 y 200 rpm con 50 mL de $V_{Llenado}$ como cultivos de baja transferencia de oxígeno, y los cultivos agitados a 200 y 250 rpm con 15 mL de $V_{Llenado}$ como cultivos de alta transferencia de oxígeno. Los valores de VTO alcanzados en los cultivos desarrollados en condiciones de alta transferencia de oxígeno, indican que la máxima transferencia de oxígeno para este sistema fue de 19 ± 0.6 mmol/L h.

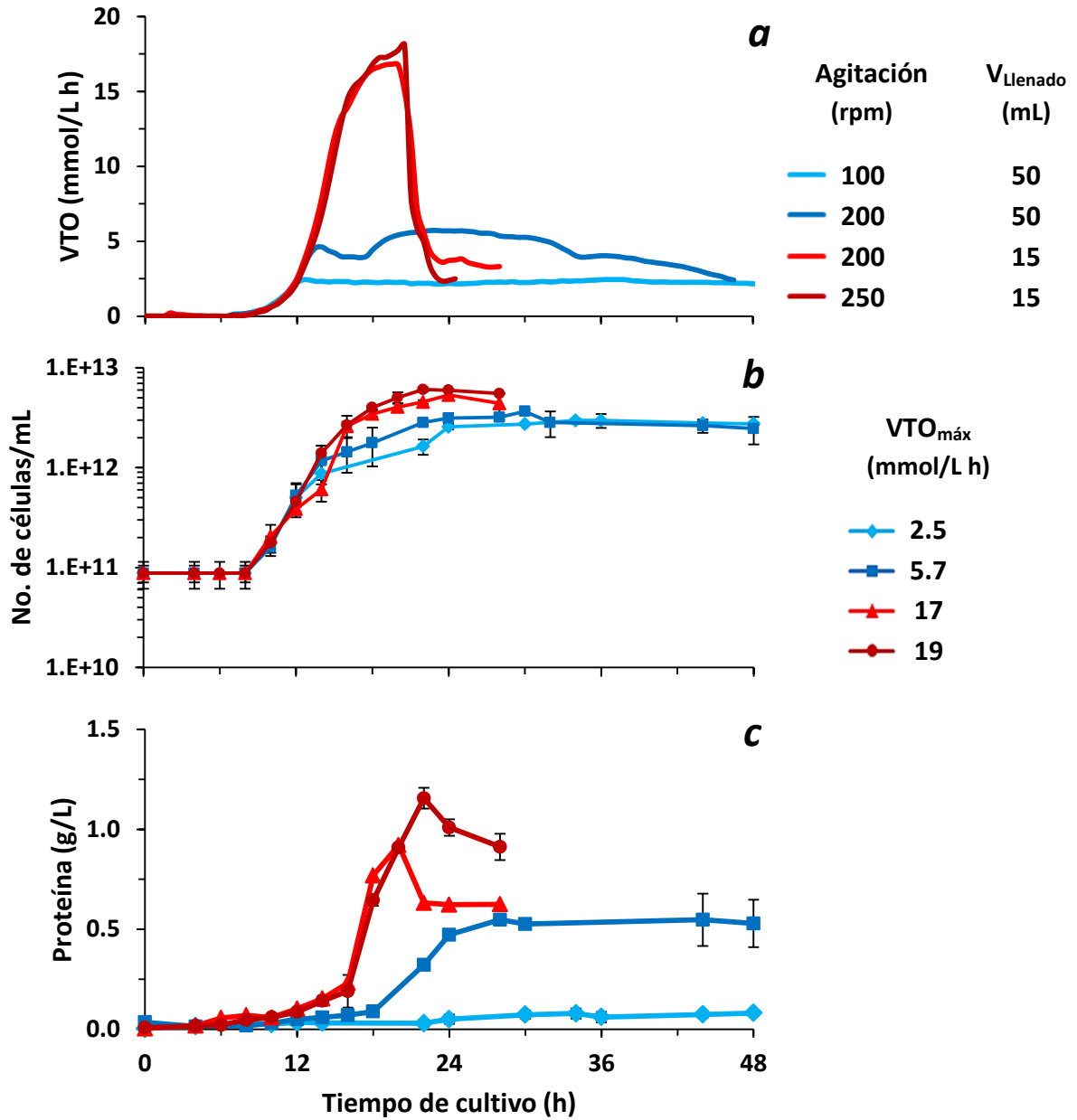


Figura 4.1. a) Perfiles de velocidad de transferencia de oxígeno, b) crecimiento celular como cuenta total y c) proteína en cultivos de *B. velezensis* 83 desarrollados en matraces a diferentes velocidades de agitación y volúmenes de llenado.

En la Figura 4.1b, se muestra el crecimiento celular, medido como cuenta total, sin diferenciar entre células vegetativas y esporas. En los cultivos limitados por oxígeno (2.5 y 5.7 mmol/L h), las máximas concentraciones celulares alcanzadas fueron de $2.9 \times 10^{12} \pm 1.8 \times 10^{11}$ cel/L con una velocidad específica de crecimiento $\mu = 0.21 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$, y $3.6 \times 10^{12} \pm 1.5 \times 10^{11}$ cel/mL con una $\mu = 0.25 \pm 0.001 \text{ h}^{-1}$,

respectivamente (Tabla 4.1). Mientras que en los cultivos no limitados por oxígeno (17 y 19 mmol/L h), las concentraciones celulares alcanzadas fueron de $5.3 \times 10^{12} \pm 6.3 \times 10^{11}$ y $6.0 \times 10^{12} \pm 3.0 \times 10^{11}$ cel/mL, con velocidades específicas de crecimiento de 0.34 ± 0.008 y $0.36 \pm 0.001 \text{ h}^{-1}$, de forma respectiva (Tabla 4.1). El análisis estadístico no mostró diferencias entre el crecimiento celular obtenido en condiciones de alta transferencia de oxígeno. Para el resto de condiciones, si se observaron diferencias significativas. Por su parte, la velocidad específica de crecimiento, fue estadísticamente diferente para cada condición.

Adicionalmente al conteo celular, también, se determinó el contenido de proteína celular (método de Lowry). Para los cultivos de baja transferencia de oxígeno, 2.5 y 5.7 mmol/L h, las máximas concentraciones de proteína fueron de 0.11 ± 0.008 y $0.54 \pm 0.13 \text{ g/L}$, respectivamente. Por su parte, en los cultivos no limitados por oxígeno, 17 y 19 mmol/L h, las concentraciones fueron de 0.92 y $1.15 \pm 0.05 \text{ g proteína/L}$, respectivamente (Tabla 4.1). El análisis estadístico demostró que las concentraciones de proteína para cada condición evaluada, fueron diferentes.

Tabla 4.1. Parámetros cinéticos de *B. velezensis* 83 cultivado bajo diferentes velocidades de transferencia de oxígeno.

VTO _{máx} (mmol/L h)	No. de células _{máx} (cel/L) $\times 10^{12} \pm \times 10^{11}$	Velocidad específica de crecimiento (h ⁻¹)	Proteína _{máx} (g/L)	qO ₂ (mmol/g proteína h)	Y _{x/s} (g proteína/g glucosa)
2.5	^a 2.9 ± 1.8	^a 0.21 ± 0.01	^a 0.11 ± 0.008	^a 11.7	^a 0.007 ± 0.0001
5.7	^a 3.6 ± 1.5	^b 0.25 ± 0.001	^b 0.54 ± 0.13	^b 22.86 ± 0.046	^b 0.037 ± 0.0002
17	^b 5.3 ± 6.3	^c 0.34 ± 0.008	0.92 †	24.72 †	0.076 ± 0.0002
19	^b 6.0 ± 3.0	^d 0.36 ± 0.001	^c 1.15 ± 0.05	^b 27 ± 0.51	^c 0.087 ± 0.001

En superíndice se indica el análisis estadístico. En cada columna, misma letra indica que no hay diferencia significativa.

† No se comparó estadísticamente.

Es importante destacar que el incremento en la VTO favoreció el crecimiento celular, al incrementarse la VTO de 2.5 a 19 mmol/L h, el crecimiento celular se duplicó, pasando de 2.9×10^{12} a 6.0×10^{12} cel/mL. Diferentes trabajos realizados con distintas cepas de *Bacillus* (Cromwick *et al.*, 1996; Guez *et al.*, 2008; Bajaj y Singhal, 2010) y con diferentes microorganismo como *Azotobacter vinelandii* (Gómez, 2015) y *Pleurotus ostreatus* (Ortíz, 2017) han reportado tendencias similares, en donde el incremento en la disponibilidad de oxígeno favoreció el crecimiento celular. Por su parte, para los mismos valores de VTO (2.5 y 19 mmol/L h), la concentración de proteína se incrementó en un orden de magnitud, pasando de 0.11 a 1.15 g/L.

Lo anterior se vio reflejado, en el consumo específico de oxígeno (qO_2), que aumentó de 11.7 a 27 mmol de O_2/g proteína h (Tabla 4.1) para valores de VTO de 2.5 y 19 mmol/L h, respectivamente.

Este fenómeno, también se observó en el rendimiento de biomasa en base al sustrato, en donde, bajo condiciones de limitación de oxígeno (2.5 y 5.7 mmol/L h), los rendimientos fueron de 0.007 ± 0.001 y 0.037 ± 0.0002 gramos de proteína por cada gramo de glucosa consumida, en comparación con los cultivos sin limitación de oxígeno, donde los rendimientos fueron de 0.076 y 0.087 $g_{proteína}/g_{glucosa}$ para 17 y 19 mmol/L h, respectivamente (Tabla 4.1).

Este comportamiento, sugiere que, bajo condiciones de alta transferencia de oxígeno, la bacteria está utilizando de manera más eficiente la fuente de carbono para el crecimiento celular, respecto de bajas transferencias de oxígeno, donde el crecimiento celular fue menor. Esto es debido a que los principales precursores esenciales para el crecimiento celular se sintetizan en la vía de las pentosas fosfato, y se ha observado que cuando *Bacillus* crece en condiciones de baja disponibilidad de oxígeno ($TOD \leq 10\%$), el flujo de carbono a través de la vía de las pentosas fosfato disminuye un 21.6 % respecto de condiciones de alta disponibilidad de oxígeno ($TOD \geq 30\%$), (Hu *et al.*, 2017).

La rápida disminución en la VTO de los cultivos desarrollados en regímenes de alta transferencia de oxígeno, indica el agotamiento de algún nutriente en el medio de cultivo, el cual coincide con el agotamiento de la glucosa alrededor de las 22 horas (Figura 4.2a), momento en que comenzó la fase estacionaria (Figura 4.1b). El consumo de la fuente de nitrógeno (sulfato de amonio) (Figura 4.2b) fue del 75 % y su consumo se detuvo al agotarse la glucosa. Este comportamiento ya había sido reportado para esta cepa por Cristiano (2012). Por su parte, a pesar de que los cultivos con VTOs de 2.5 y 5.7 mmol/L h se encontraron limitados por oxígeno desde etapas tempranas del crecimiento (desde las 12 horas), el crecimiento celular siguió incrementándose hasta las 24 y 36 horas de cultivo, respectivamente. Esto lleva a establecer que los cultivos se desarrollaron en condiciones de microaerofilia, por lo que la respiración celular se vio limitada y otras vías de fermentación proporcionaron la energía necesaria para el crecimiento celular. En este sentido, probablemente la energía fue generada a través de la fosforilación a nivel sustrato por oxidación del amonio (Nakano y Hulett, 1997) y por la síntesis de metabolitos de reserva (acetoína y 2,3-butanodiol), los cuales contribuyeron a mantener el balance interno de óxido-reducción (como se comenta más adelante) (Celinska y Grajek, 2009).

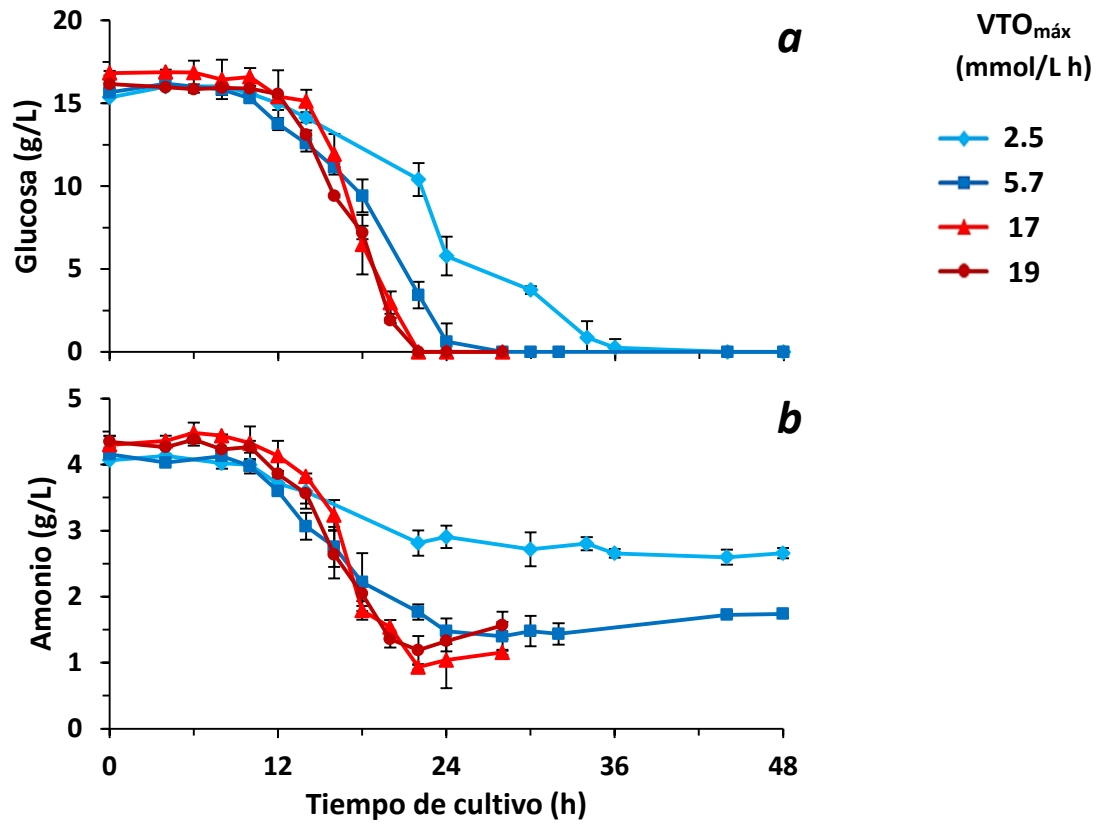


Figura 4.2. a) Consumo de glucosa y b) consumo de amonio en cultivos de *B. velezensis* 83 desarrollados bajo diferentes velocidades de transferencia de oxígeno.

Otro aspecto importante a destacar, es el hecho de que el tiempo de duración del cultivo se prolongó al disminuir la VTO. Esto probablemente se deba a que en condiciones de baja transferencia de oxígeno, la concentración de oxígeno disponible, no fue suficiente para metabolizar la fuente de carbono presente en el caldo.

4.2 Producción de 2,3-butanodiol, acetoína y ácido acético

Se determinó la producción de acetoína, 2,3-butanodiol y ácido acético como indicadores del flujo de carbono y de la disponibilidad de oxígeno en el cultivo.

Como se puede observar en la Figura 4.3a, en los cultivos desarrollados bajo limitación de oxígeno, las máximas producciones de 2,3-butanodiol fueron de 3.1 ± 0.33 y 1.3 ± 0.39 g/L, con rendimientos de 0.2 ± 0.02 y 0.1 ± 0.04 g_{2,3-butanodiol}/g_{glucosa} (Tabla 4.2), para VTOs de 2.5 y 5.7 mmol/L h, respectivamente. Por su parte, en los cultivos sin limitación de oxígeno, la producción de 2,3-butanodiol se encontró por debajo de 0.4 g/L.

Respecto a la producción de acetoína (Figura 4.3b), para VTOs de 5.7, 17 y 19 mmol/L h, las máximas concentraciones se encontraron entre los 2.0 ± 0.004 y 2.6 ± 0.015 g/L, entre las 24 y 28 horas de cultivo, con rendimientos de 0.16 ± 0.02 , 0.12 ± 0.009 y 0.14 ± 0.01 g_{acetoína}/g_{glucosa}, respectivamente (Tabla 4.2). Mientras que, para el cultivo que presentó la más baja VTO de 2.5 mmol/L h, se alcanzó una producción de 3.3 ± 0.67 g/L, con un rendimiento de 0.19 ± 0.05 g_{acetoína}/g_{glucosa} (Tabla 4.2).

En el caso del 2,3-butanodiol, las mayores concentraciones se alcanzaron en el momento en que se agotó la glucosa en el medio, después de lo cual, las concentraciones disminuyeron. Para el caso de la acetoína, las máximas concentraciones se presentaron una vez que disminuyó la producción del 2,3-butanodiol. Para que el 2,3-butanodiol sea consumido por la célula, primero debe ser transformado a acetoína, luego a α -cetolactato y posteriormente a piruvato para ser incorporado al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Celinska y Grajek, 2009).

Por otra parte, el ácido acético (Figura 4.3c) alcanzó producciones de 1 g/L para condiciones de alta transferencia de oxígeno, mientras que en condiciones de baja transferencia de oxígeno, la concentración se encontró por debajo de los 0.2 g/L. Una de las funciones de la producción de acetoína y su conversión a 2,3-butanodiol es la prevención de la acidificación intracelular por la acumulación de acetato (forma ionizada del ácido acético), por lo que la caída en las concentraciones de estos metabolitos conduce a un incremento en la producción del ácido acético hacia el final del cultivo (Figura 4.3c).

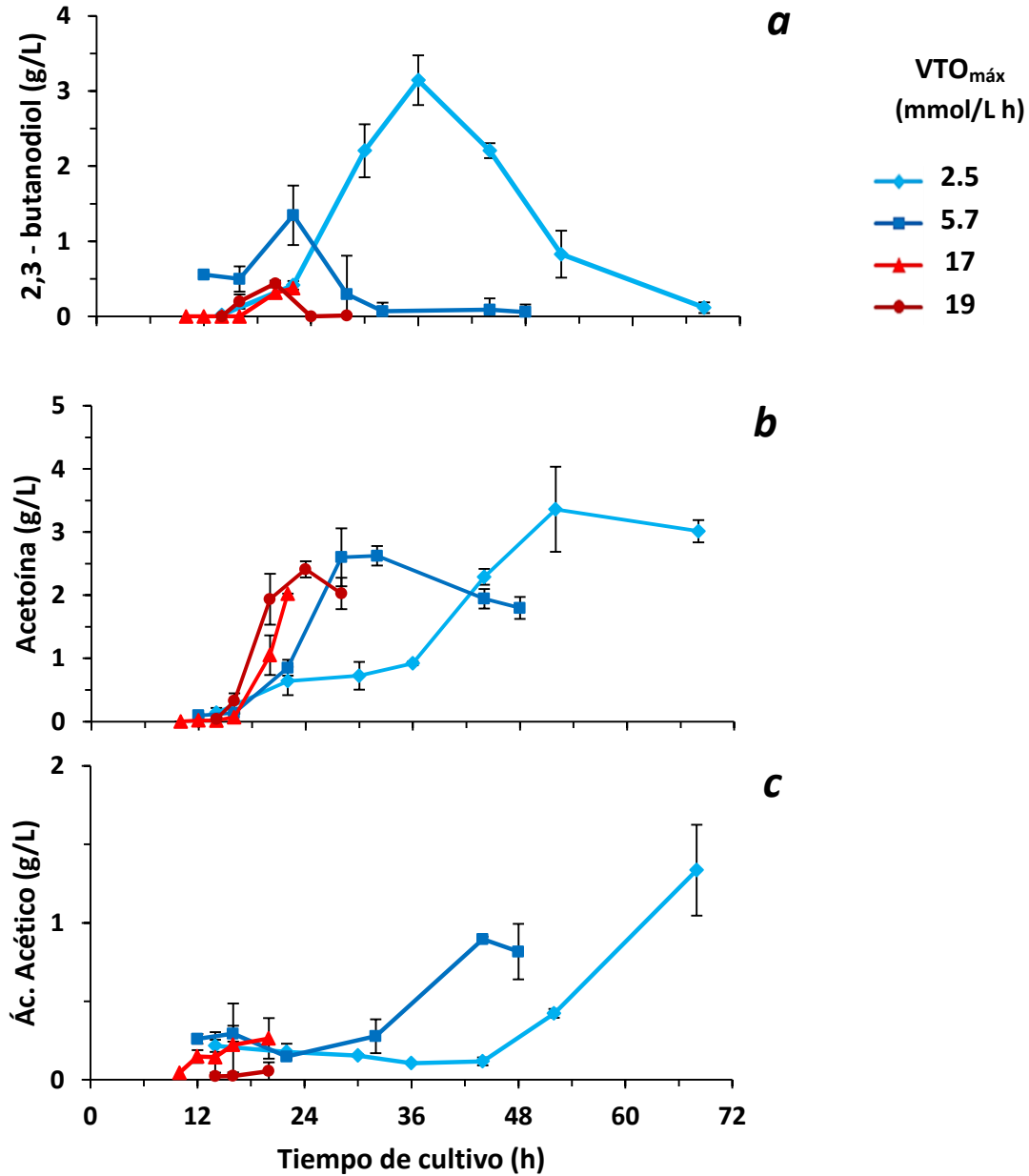


Figura 4.3. Producción de a) 2,3-butanodiol, b) acetoína y c) ácido acético en cultivos de *B. velezensis* 83 desarrollados bajo diferentes velocidades de transferencia de oxígeno.

Tanto para el 2,3-butanodiol, la acetoína y el ácido acético, las mayores producciones se presentaron en la condición de más baja transferencia de oxígeno (2.5 mmol/L h). Lo anterior, es debido a que en condiciones de baja disponibilidad de oxígeno, la producción de acetoína y 2,3-butanodiol previene la acidificación intracelular (debido al incremento en la concentración del NADH procedente de la glucólisis), mediante el balance de los cofactores NADH y NAD⁺ que tiene lugar durante la

interconversión entre la acetoína y el 2,3-butanodiol (Syu, 2001). Además, como el flujo de carbono a través de la vía de las pentosas fosfato se ve reducido en condiciones de baja disponibilidad de oxígeno, la síntesis de acetoína y 2,3-butanodiol (por fosforilación a nivel sustrato), podría contribuir a la generación de la energía necesaria para el crecimiento, mantenimiento y diferenciación celular. Esto último es importante, debido a que la diferenciación a espora es un proceso energéticamente costoso (Siebring *et al.*, 2014) que requiere de fuentes de energía alternas como lo podrían ser la acetoína, el 2,3-butanodiol y el ácido acético (Cristiano, 2012; Mallqui, 2016; Soriano 2016).

Tabla 4.2. Concentraciones máximas y rendimientos de 2,3-butanodiol, acetoína y ácido acético producidos en cultivos de *B. velezensis* 83 desarrollados bajo diferentes velocidades de transferencia de oxígeno.

VTO _{máx} (mmol/L h)	2,3-butanodiol (g/L)	Acetoína (g/L)	Ác. acético (g/L)	Y g but/g glu	Y g aceto/g glu	Y g acético/g glu
2.5	^a 3.1 ± 0.33	^a 3.3 ± 0.67	^a 1.3 ± 0.28	^a 0.20 ± 0.02	^a 0.19 ± 0.05	^a 0.08 ± 0.01
5.7	^b 1.3 ± 0.39	^b 2.6 ± 0.15	^b 0.9 ± 0.01	^b 0.11 ± 0.04	^b 0.16 ± 0.02	^b 0.05 ± 0.0009
17	^c 0.3 ± 0.07	^c 2.0 ± 0.004	^c 0.2 ± 0.12	^c 0.02 ± 0.0009	^c 0.12 ± 0.009	^b 0.05 ± 0.02
19	^c 0.4 ± 0.03	^b 2.4 ± 0.12	^c 0.4 ± 0.02	^c 0.03 ± 0.001	^c 0.14 ± 0.01	^b 0.06 ± 0.004

Y g but/g glu Y g 2,3- butanodiol/g glucosa

Y g aceto/g glu Y g acetoína/g glucosa

Y g acético/g glu Y g ác. acético/g glucosa

En superíndice se indica el análisis estadístico. En cada columna, misma letra indica que no hay diferencia significativa.

4.3 Coeficiente de respiración

A través de las velocidades de producción de CO₂ y del consumo de oxígeno, se puede determinar el coeficiente de respiración (CR) que indica la actividad metabólica de la bacteria, ya sea del sustrato empleado o la síntesis de los diferentes productos (Xiao *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2017).

La Figura 4.4 muestra los perfiles del CR para cada una de las condiciones evaluadas. Para todas las condiciones, el CR aumentó rápidamente alrededor de las 12 horas, momento en que comenzó el consumo de glucosa. Los valores máximos de CR se presentaron en el momento en que se produjo el agotamiento de la glucosa. Los cultivos desarrollados a una VTO_{máx} de 2.5 y 5.7 mmol/L h alcanzaron

un CR máximo de 2.7 ± 0.01 y 2.0 ± 0.04 , respectivamente; mientras que, para las VTOs máximas de 17 y 19 mmol/L h, los valores máximos de CR fueron de 1.6 ± 0.27 y 1.8 ± 0.3 , respectivamente. El único valor de CR con diferencias significativas fue el de 2.7 de la condición de más baja transferencia de oxígeno (2.5 mmol/L h). Posteriormente, el CR disminuyó a valores cercanos a 0.6.

Teóricamente, un CR de 1, significa que la glucosa es completamente oxidada a CO_2 y a agua, a través del ciclo de los ácidos tricarbónicos y la cantidad de CO_2 producido es proporcional a la cantidad de oxígeno consumido (Xiao *et al.*, 2006).

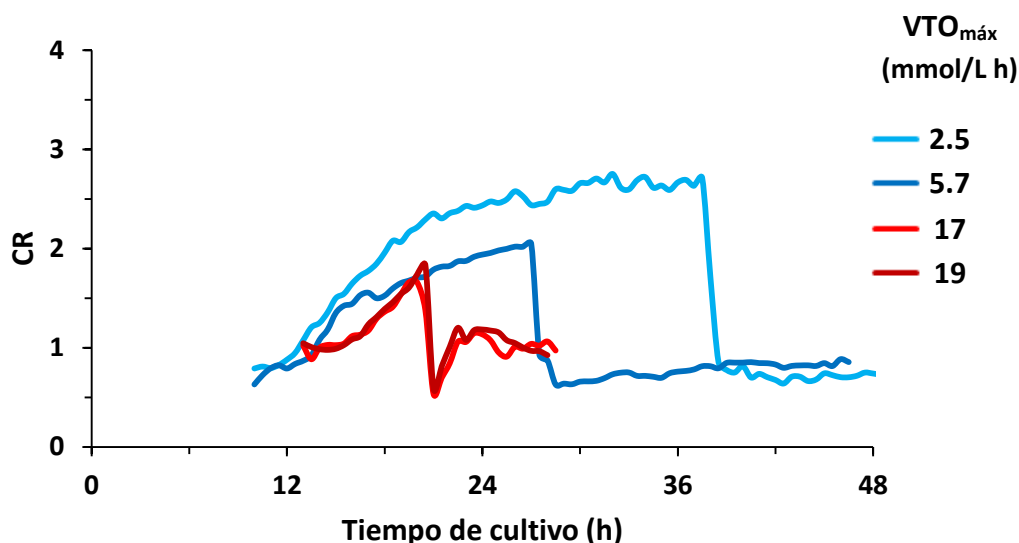


Figura 4.4. Coeficiente de respiración para los cultivos de *B. velezensis* 83 desarrollados bajo diferentes velocidades de transferencia de oxígeno.

Tanto para las condiciones limitadas por oxígeno, así como para las no limitadas, el CR durante la fase de crecimiento exponencial, presentó valores superiores a la unidad. El aumento en el CR significa que el flujo de carbono a través del ciclo de los ácidos tricarbónicos se incrementó, provocando que la producción de CO_2 fuera mayor a la cantidad de oxígeno consumido y generando altas producciones de NADH y ATP (Xiao *et al.*, 2006).

Por otro lado, los coeficientes de respiración teóricos para la óptima producción de acetoína y 2,3-butanodiol son de 2 y 4, respectivamente. Dado que para VTOs de 5.7, 17 y 19 mmol/L h, los máximos valores de CR fueron de 2.0, 1.6 y 1.8, respectivamente y para una VTO de 2.5 mmol/L h, el $\text{CR}_{\text{máx}}$ fue

de 2.7. El coeficiente de respiración parece estar relacionado con la producción de acetoína y en menor medida con la síntesis del 2,3-butanodiol.

La disminución del CR a valores cercanos a 0.6 indica un cambio en la actividad metabólica, probablemente debido al consumo de la acetoína y el 2,3-butanodiol como fuentes de carbono y energía.

4.4 Consumo de potencia volumétrica y viscosidad del caldo de cultivo

La Figura 4.5a muestra los perfiles del consumo de potencia de las diferentes condiciones evaluadas. El consumo de potencia del cultivo desarrollado a una $VTO_{m\acute{a}x}$ de 2.5 mmol/L h se mantuvo constante en valores cercanos a 0.1 kW/m^3 durante todo el cultivo. Para el resto de condiciones, el consumo de potencia aumentó exponencialmente a partir de las 12 horas de cultivo. El cultivo desarrollado a 5.7 mmol/L h alcanzó un máximo de 0.7 kW/m^3 a las 22 horas; mientras que, el cultivo desarrollado a una VTO de 17 mmol/L h alcanzó una potencia máxima de 1.2 kW/m^3 entre las 18 y las 22 horas. Por su parte, el consumo de potencia para el cultivo desarrollado con una VTO de 19 mmol/L h fue de 1.5 kW/m^3 , entre las 18 y las 20 horas de cultivo.

Como era de esperarse, el consumo de potencia aumentó al incrementarse la velocidad de agitación y al disminuir el volumen de llenado del matraz. Dado que la potencia es responsable de la transferencia de masa y energía, el incremento en este parámetro, influyó directamente en la duración del cultivo. En este sentido, es coherente que el cultivo que presentó el más bajo consumo de potencia de 0.1 kW/m^3 ($VTO_{m\acute{a}x} = 2.5 \text{ mmol/L h}$) se haya extendido por más de 72 horas (datos no mostrados), respecto de los demás cultivos con mayor consumo de potencia (1.2 y 1.5 kW/m^3), en donde el tiempo de cultivo fue de 24 horas.

Sin embargo, la velocidad de agitación y el volumen de llenado del matraz no son los únicos factores que determinan el consumo de energía por el sistema, ya que de ser así, los valores de la P/V permanecerían constantes durante todo el cultivo. Por lo que las diferencias en la potencia observadas durante el tiempo de cultivo, también se deben al incremento en la viscosidad del caldo, como se comenta a continuación.

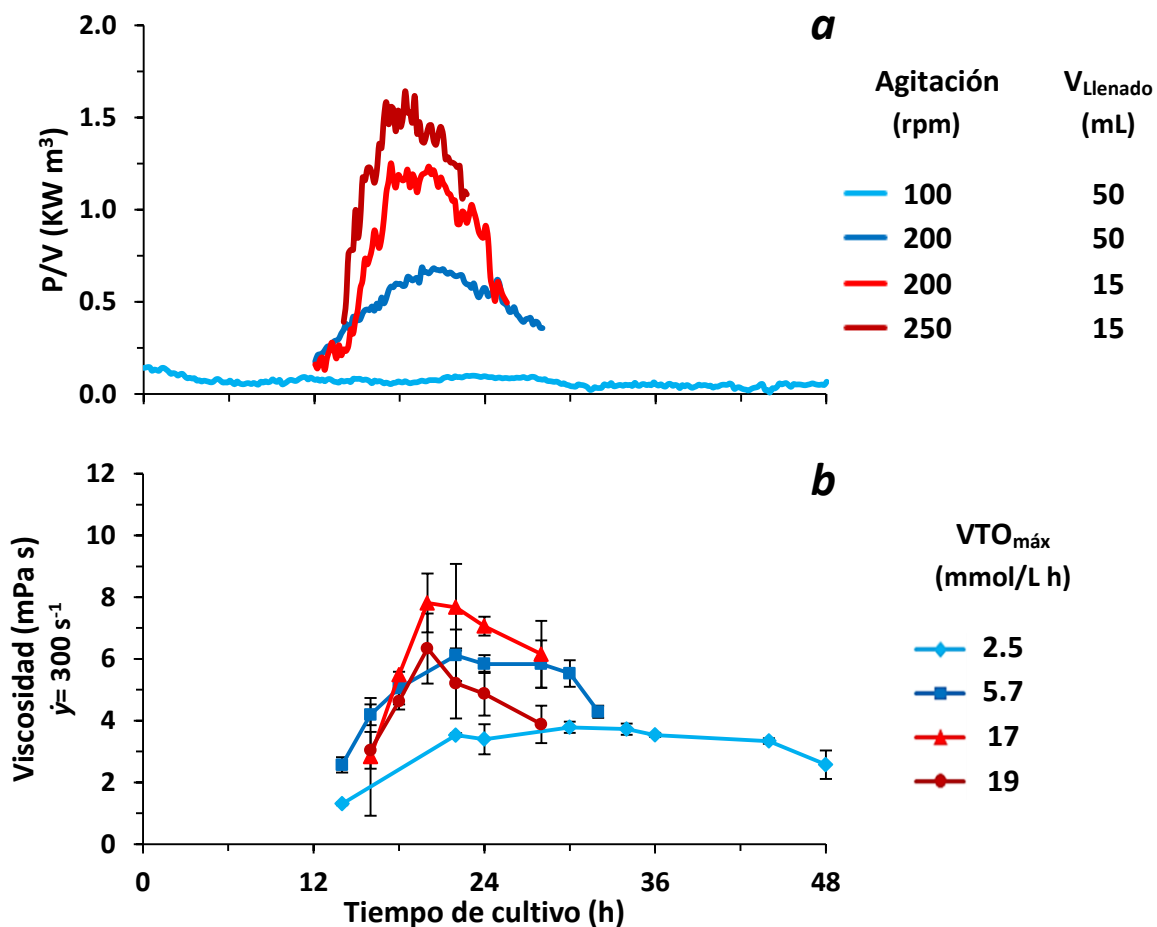


Figura 4.5. a) Perfiles de consumo de potencia volumétrica y b) perfiles de viscosidad de cultivos de *B. velezensis* 83 desarrollados a diferentes velocidades transferencia de oxígeno. Viscosidad aparente medida a una velocidad de deformación de 300 s⁻¹.

En la Figura 4.5b se puede observar que el cultivo agitado a una VTO_{máx} de 2.5 mmol/L h fue el que presentó la menor viscosidad, de 3.7 ± 0.17 mPa s desde las 22 horas y permaneció constante hasta las 44 horas, para después disminuir lentamente hasta el final del cultivo. Para el resto de las condiciones, la viscosidad aumentó rápidamente aproximadamente a las 12 horas alcanzando sus máximos valores alrededor de las 20 horas, para posteriormente disminuir a valores cercanos a los 4 mPa s. El cultivo desarrollado a una VTO_{máx} de 5.7 mmol/L h presentó una viscosidad máxima promedio de 6.1 ± 0.4 mPa s de las 18 a las 30 horas de cultivo. Los cultivos desarrollados a VTOs de 17 y 19 mmol/L h presentaron viscosidades máximas de 8 ± 0.95 y 6.3 ± 1.13 mPa s, respectivamente, a las 20 horas de cultivo. Estadísticamente, la viscosidad del cultivo de más baja transferencia de oxígeno (2.5 mmol/L h) fue la única diferente, respecto de las viscosidades de las demás condiciones

evaluadas, lo que sugiere que las máximas viscosidades para este sistema se encuentran alrededor de los 6.5 mPa s.

Al comparar las viscosidades máximas alcanzadas para cada condición evaluada en función de los máximos valores de VTO, se observa que se presentó una relación directa entre ambos parámetros, debido a que al aumentar la VTO de 2.5 a 5.7 mmol/L h, la viscosidad se incrementó de 3.7 a 6.1 mPa s. Sin embargo, para valores de VTO de 17 y 19 mmol/L h, la viscosidad del caldo se mantuvo constante, por lo que para VTOs iguales o mayores a 5.7 mmol/L, la viscosidad es independiente de la velocidad de transferencia de oxígeno.

Wilming *et al.* (2013) observaron que para cultivos de *B. licheniformis*, viscosidades de aproximadamente 60 mPa s, se obtuvieron a una VTO cercana a los 20 mmol/L h, respecto de condiciones de mayor transferencia de oxígeno (≈ 60 mmol/L h), donde las viscosidades alcanzadas fueron menores (≈ 22 mPa s).

El incremento en el consumo de potencia correlacionó con el incremento en la viscosidad del caldo (medida a una velocidad de deformación de $\dot{\gamma}=300$ s⁻¹) para los cultivos desarrollados a VTOs de 5.7, 17 y 19 mmol/L h. Ambos perfiles se incrementaron exponencialmente a partir de las 12 horas, alcanzando sus valores máximos entre las 18 y 20 horas de cultivo, después de ello, ambos perfiles disminuyeron. Otro fenómeno observado e importante de destacar es que, al incrementarse la viscosidad a 8 mPa s, el consumo de potencia aumentó a 1.2 kW/m³, mostrando un fuerte impacto de la viscosidad sobre la P/V, comparable con lo reportado por Meissner *et al.* (2017), en donde viscosidades alrededor de 10 mPa s, generaron un consumo de potencia cercano a los 2 kW/m³.

El comportamiento antes mencionado no se vio reflejado para el cultivo de más baja transferencia de oxígeno (2.5 mmol/L h), que presentó una viscosidad máxima de 3.7 mPa s y un consumo de potencia cercano a 0.1 kW/m³. Este bajo consumo de potencia puede asociarse al hecho de que la viscosidad es demasiado baja como para provocar cambios en la P/V y/o el movimiento del líquido dentro del matraz es muy poco, provocando que el diferencial del torque entre el sistema líquido y el sólido sea cercano a cero (Pliego, 2014).

Con respecto a la energía suministrada al sistema, se determinó que hasta el momento en que se presentaron las mayores viscosidades para los cultivos desarrollados a VTOs de 5.7, 17 y 19 mmol/L h, el suministro de energía fue de 4.3, 6.7 y 7.8 kW h/m³, respectivamente (Tabla 4.3). Este incremento en la cantidad de energía entregada al sistema, es debido a que el aumento de la viscosidad del caldo

de cultivo conduce a una mayor fricción entre el caldo y las paredes internas y el fondo del matraz, lo que a su vez retrasa el movimiento del líquido respecto al movimiento giratorio de la maquina agitadora, para contrarrestar esta oposición al flujo, es necesario suministrar mayor energía al sistema. Por otro lado, el incremento en el consumo de energía también es debido al incremento en la velocidad de agitación y a la disminución del volumen de llenado del matraz (Sección 1.3.1) Por su parte, el suministro de energía para el cultivo con una VTO de 2.5 mmol/L h fue de 2.9 kW h/m³.

Gómez (2015) determinó el consumo de energía durante la producción de alginato en cultivos en matraces de *Azotobacter vinelandii*, reportando que una viscosidad de 7 mPa s consume 0.4 kW h/m³ de energía. Aunque las condiciones de operación reportadas por Gómez (2015) son diferentes a las empleadas en el presente trabajo, es evidente que los suministros de energía para cultivos de *B. velezensis* 83 se encuentran muy por encima de los determinados para cultivos de *A. vinelandii*, ya que en el presente trabajo, una viscosidad de 8 mPa s generó un consumo de energía de 6.7 kW h/m³. Estos altos consumos de energía (y por ende altos consumos de potencia), podrían deberse a las características reológicas del caldo de cultivo, que como se comenta en la sección 4.6, presenta propiedades pseudoplásticas y viscoelásticas.

Tabla 4.3. Consumo de potencia volumétrica máxima, energía suministrada y viscosidad máxima de cada cultivo de *Bacillus velezensis* 83 desarrollados bajo diferentes velocidades de transferencia de oxígeno.

VTO _{máx} (mmol/L h)	P/V _{máx} (kW/m ³)	E (kW h/m ³)	Viscosidad _{máx} (mPa s) $\dot{\gamma} = 300 \text{ s}^{-1}$
2.5	0.1	2.9	^a 3.7 ± 0.17
5.7	0.7	4.3	^b 6.1 ± 0.83
17	1.2	6.7	^b 8 ± 0.95
19	1.5	7.8	^b 6.3 ± 1.13

En superíndice se indica análisis estadístico. Letras iguales indican que no hay diferencia significativa.

4.5 Producción y peso molecular del PGA

Comúnmente, el incremento en la viscosidad del caldo de cultivo se atribuye a la producción de PGA y son pocos los trabajos en los que se han determinado la producción y el peso molecular del polímero. Por lo anterior, en el presente trabajo, se cuantificó tanto la producción así como el peso molecular del PGA, para entender la influencia de la VTO sobre estos dos parámetros.

Los perfiles de producción del PGA mostraron que para todos los cultivos, la concentración de PGA aumentó rápidamente a partir de las 12 horas (Figura 4.6a). Los cultivos desarrollados en baja transferencia de oxígeno (2.5 y 5.7 mmol/L h, respectivamente) alcanzaron concentraciones máximas de 0.7 ± 0.10 y 1.2 ± 0.12 g/L de PGA a partir de las 30 y 20 horas, respectivamente, después de lo cual la concentración de PGA disminuyó lentamente. Para los cultivos en alta transferencia de oxígeno (17 y 19 mmol/L h, respectivamente), la producción de PGA alcanzó concentraciones de 2.0 ± 0.18 y 1.40 ± 0.09 g/L, respectivamente. El análisis estadístico demostró que las máximas concentraciones de PGA para cada condición, fueron diferentes, excepto entre los cultivos desarrollados a VTOs de 5.7 y 19 mmol/L h.

Aunque la producción del polímero fue baja (como se comenta más adelante), se presentó una relación directa entre la VTO y la producción del polímero, ya que al incrementarse la VTO de 2.5 a 17 mmol/L h, la concentración de PGA aumentó de 0.8 a 2 g/L. Sin embargo, a valores de VTO mayores (19 mmol/L h), la producción de PGA disminuyó (1.4 g/L). Un efecto similar fue observado por Bajaj y Singhal (2010), al modificar la velocidad de aireación y la agitación, consecuentemente se modificó la VTO; y reportaron que en cultivos desarrollados a una misma velocidad de aireación (1 vvm), al incrementar la velocidad de agitación de 250 a 750 rpm, la producción de PGA se incrementó de 35 a 45 g/L. Cabe resaltar que, al aumentar aún más la VTO por incremento en la agitación a 1000 rpm, la producción de PGA disminuyó drásticamente a 23 g/L. De forma similar, a una misma agitación (750 rpm), al incrementar la aireación de 1 a 2 vvm, la producción de PGA aumentó ligeramente de 42 a 47 g/L de PGA, pero al aumentar la aireación a 3 vvm, la producción de PGA fue de 25 g/L.

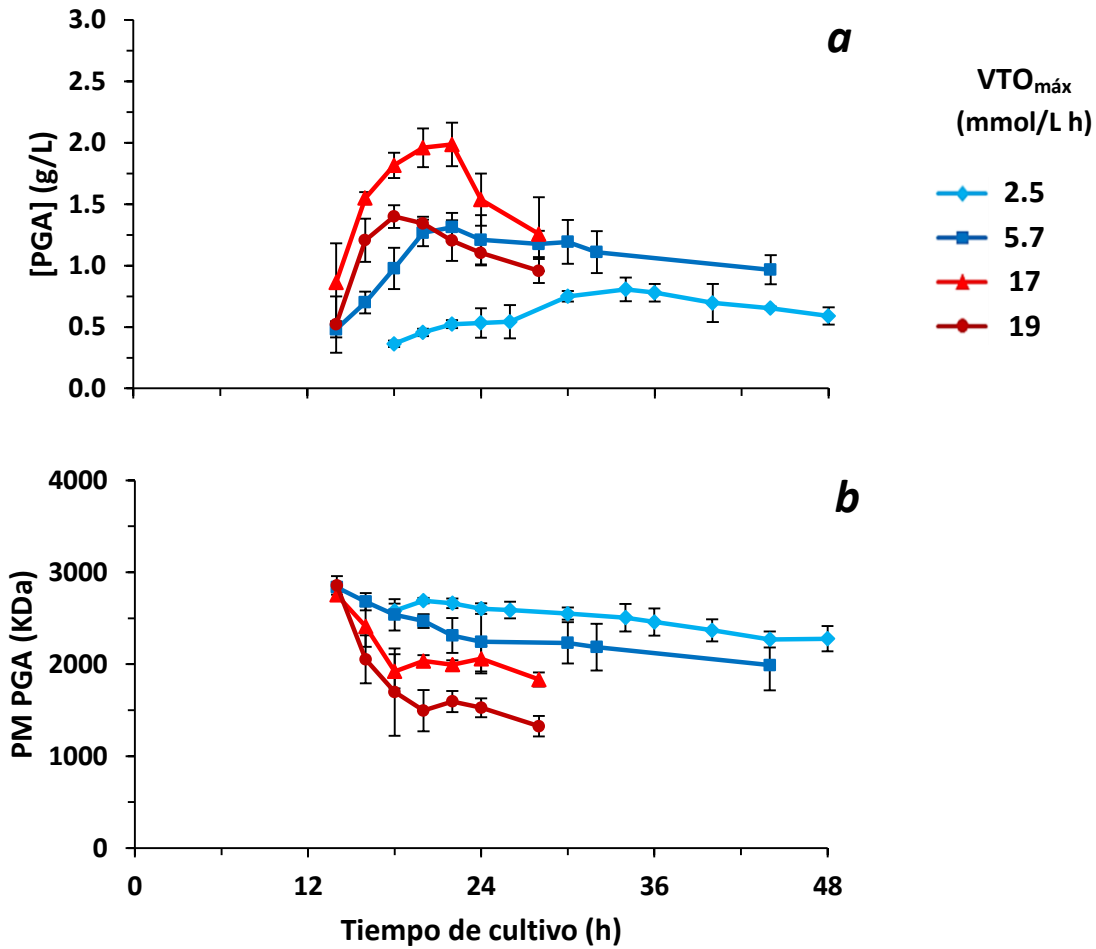


Figura 4.6. a) Producción volumétrica de PGA y b) peso molecular del PGA producido en cultivos de *B. velezensis* 83 desarrollados bajo diferentes velocidades de transferencia de oxígeno.

En general, las concentraciones del polímero fueron significativamente más bajas (menos de 2 g/L) en comparación con los trabajos reportados en la literatura enfocados a la optimización de la producción del polímero, en donde se obtienen concentraciones de PGA que van desde los 20 hasta los 100 g/L (Luo *et al.*, 2016). Es importante mencionar que en la mayoría de los trabajos en la literatura, se utilizan cepas de *B. licheniformis* y *B. subtilis* las cuales son definidas como especies productoras de PGA utilizadas para la producción industrial del polímero. Otro aspecto a considerar es que, en el presente proyecto se trabajó con un medio mineral diseñado para optimizar la producción de esporas viables de *B. velezensis* 83 (Cristiano, 2012), que a diferencia de la mayoría de los trabajos disponibles en la literatura, emplean medios diseñados para favorecer la producción del PGA y que se encuentran enriquecidos con altas concentraciones de fuente de carbono como glucosa, glicerol, ácido cítrico y glutamato (Wilming *et al.*, 2013). Es conveniente recordar que este último, es

el precursor directo del PGA, y que en el presente trabajo, *B. velezensis* 83, al no ser una bacteria dependiente de glutamato, tuvo que sintetizar el precursor de *novo*.

En la Figura 4.6b, se muestra el peso molecular promedio del PGA producido por *B. velezensis* 83. En el cultivo desarrollado a una VTO de 2.5 mmol/L h, la bacteria sintetizó polímero con un peso molecular promedio de $2\,400 \pm 34$ kDa, el cual se mantuvo prácticamente constante hasta el final del cultivo. Para el resto de las condiciones evaluadas, el peso molecular promedio del PGA fue de alrededor de 2 850 kDa a las 14 horas de cultivo, sin embargo, a partir de este punto se observó una disminución importante en el peso molecular, debido probablemente a la degradación del polímero por acción de depolimerasas. Se sabe que *Bacillus* puede sintetizar enzimas capaces de degradar el PGA: las endo- γ -glutamyltranspeptidasas que generan fragmentos de PGA que van de los 20 a los 1000 kDa, y la exo- γ -glutamyltranspeptidasa encargada de generar monómeros de ácido glutámico (Luo *et al.*, 2016), que posteriormente transforma en α -cetoglutarato para ser incorporado al ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

Dado que el peso molecular del PGA fue más alto en etapas tempranas del cultivo y disminuyó a lo largo de la fermentación, al comparar los perfiles de pesos moleculares del PGA en función de $VTO_{\text{máx}}$ para cada condición (Figura 4.6b), se observó que la velocidad y el grado de disminución del peso molecular promedio fueron función directa de la VTO. Se sabe que en cultivos de *Azotobacter vinelandii*, durante la producción de alginato, la actividad de enzimas polimerasas y depolimerasas es influenciada por la disponibilidad de oxígeno en el cultivo (Flores *et al.*, 2014). Es probable que el incremento en la disponibilidad de oxígeno ejerza un efecto negativo sobre la actividad del complejo PGA polimerasa (PgsBCA) y/o la expresión del sistema de dos componentes DegS-DegU y del sistema *quorum sensing* ComP-ComA. Ambos sistemas activan la transcripción de *pgsBCA* que codifican para las proteínas que conforman el complejo PgsBCA sintetasa, y responden a condiciones ambientales como la osmolalidad y la fase en la que se encuentra la bacteria (Hsueh *et al.*, 2017). Un primer acercamiento a lo planteado, es el hecho de que en un cultivo de *B. velezensis* 83, accidentalmente limitado por oxígeno, el gen *pgsA* (responsable de la remoción de la cadena de PGA del sitio activo del complejo Pgs BCA polimerasa para la adición del siguiente monómero de glutamato transportar la cadena a través de la membrana) (Luo *et al.*, 2016), se expresó 144 veces más respecto de los cultivos no limitados por oxígeno (Soriano, 2016). No obstante, también hay que considerar la disminución del peso molecular por actividad de las diferentes depolimerasas producidas por *Bacillus*, en respuesta al oxígeno y al agotamiento de la fuente de carbono.

Los pesos moleculares promedio reportados en el presente trabajo (a las 14 horas), son muy cercanos a los pesos moleculares de aproximadamente 2 600 kDa reportados por Bajaj y Singhal (2010) y por Meissner *et al.* (2017), lo que es interesante, considerando que los trabajos realizados por estos autores estuvieron enfocados a optimizar la producción de PGA, utilizando cepas de *B. licheniformis* productoras de PGA y utilizando medios de cultivo específicos para tal fin. Lo anterior, convierte a *B. velezensis* 83 en un modelo interesante de estudio para la producción de PGA de alto peso molecular.

Al comparar los perfiles de producción y peso molecular del PGA respecto del incremento en la viscosidad para cada una de las condiciones evaluadas, es evidente que el aumento en la viscosidad del caldo de cultivo se debe principalmente al incremento de la producción del PGA. Lo anterior, contrasta con lo reportado por Meissner *et al.* (2017), quienes reportaron que para cultivos de *B. licheniformis*, el cambio en el peso molecular del PGA tiene más influencia sobre la viscosidad del caldo, que la concentración del polímero.

4.6 Características reológicas del caldo de cultivo

En la Figura 4.7 se presentan los reogramas de los caldos de cultivos desarrollados a diferentes condiciones de VTO. Los caldos presentaron un comportamiento pseudoplástico en el que la viscosidad disminuyó al incrementarse la velocidad de deformación. Este comportamiento ya ha sido reportado para cultivos de *B. subtilis* y *B. licheniformis* (Richard y Margaritis, 2003; Bajaj y Singhal, 2010). Sin embargo, esta caracterización reológica no se había reportada para el caldo de cultivo de *B. velezensis* 83, hasta el presente trabajo.

El cultivo desarrollado a una $VTO_{m\acute{a}x}$ de 17 mmol/L h fue el que presentó la mayor viscosidad y el mayor comportamiento pseudoplástico, respecto a los demás cultivos, tendencia que se vio reflejada en los valores de los índices de consistencia (k) y de fluidez (n). El índice de consistencia, indica la consistencia del fluido, si k aumenta, entonces, el fluido es más viscoso. Por su parte, el índice de flujo, es una medida del comportamiento no newtoniano, si $n > 1$, el fluido presenta un comportamiento dilatante, mientras que si $n < 1$, entonces se trata de un fluido pseudoplástico.

El valor de $k_{m\acute{a}x}$ fue de 0.045 ± 0.006 Pa s, con un índice de fluidez máximo de 0.693 ± 0.005 . En el resto de las condiciones evaluadas, los índices de consistencia fueron menores, mientras que los índices de flujo se encontraron más cercanos a 1 (Tabla 4.4).

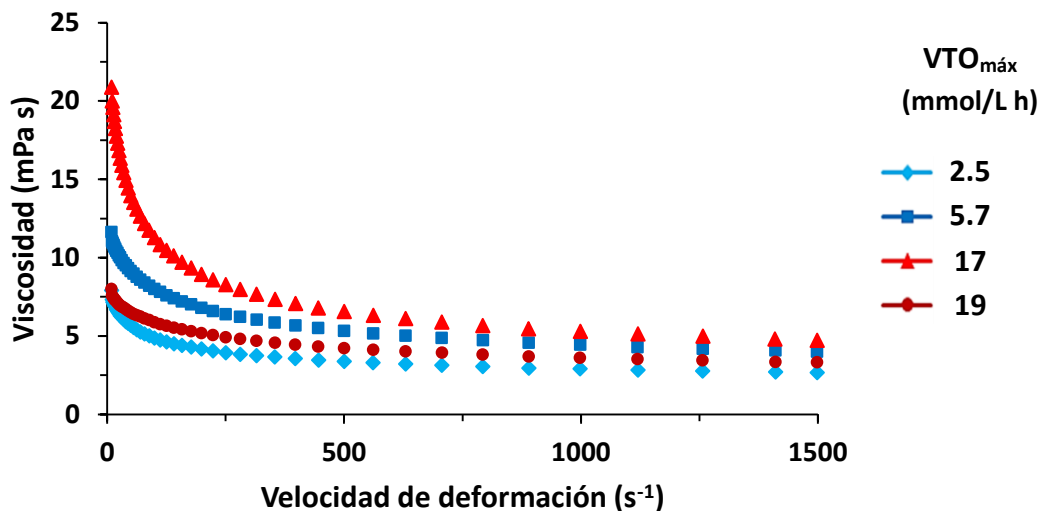


Figura 4.7. Reogramas de los caldos de cultivo de *B. velezensis* 83 desarrollados bajo diferentes velocidades de transferencia de oxígeno. Los reogramas corresponden al tiempo de cultivo en que se presentó la máxima viscosidad para cada condición evaluada.

Tabla 4.4. Índices de consistencia (*k*) y fluidez (*n*) máximos y su correspondientes producciones y pesos moleculares de PGA de cultivos de *B. velezensis* 83 desarrollados bajo diferentes velocidades de transferencia de oxígeno.

VTO _{máx} (mmol/L h)	k _{máx} (Pa s)	n _{máx}	PGA _{máx} (g/L)	PM _{máx} PGA (kDa)
2.5	0.012 ± 0.002	0.775 ± 0.027	^a 0.8 ± 0.03	^a 2 400 ± 52
5.7	0.020 ± 0.004	0.753 ± 0.022	^b 1.2 ± 0.12	^b 2 836 ± 170
17	0.045 ± 0.006	0.693 ± 0.005	^c 2 ± 0.18	^b 2 750 ± 62
19	0.030 ± 0.001	0.838 ± 0.051	^b 1.4 ± 0.09	^b 2 850 ± 224

En superíndice se indica el análisis estadístico. Letras iguales en cada columna indican que no hay diferencia significativa.

Richard y Margaritis (2003) estudiaron las propiedades reológicas del caldo de cultivo de *B. subtilis* durante la producción de PGA. El índice de flujo alcanzó un valor de 0.885, lo que sugiere que el caldo de *B. subtilis* mostró un menor comportamiento pseudoplástico respecto al caldo de cultivo de *B. velezensis* 83 (Tabla 4.4). El índice de consistencia fue de 0.42 Pa s, un orden de magnitud mayor a los valores de *k* determinados para el caldo de *B. velezensis* 83 (Tabla 4.4), lo que concuerda con la alta viscosidad aparente de alrededor de 250 mPa s, los autores no especifican la velocidad de deformación con la que se determinó la viscosidad.

Dado que al índice de consistencia esta relacionado directamente con la concentración del polímero y sus características fisicoquímicas, la comparación entre los máximos valores de k y los máximos valores de producción y peso molecular del polímero, para cada condición, mostró una relación directa entre los valores de k y la producción de PGA. Por el contrario, se presentó una relación inversa entre el peso molecular del PGA y los valores de k . De lo anterior podemos concluir que el incremento en el valor de k indica un aumento en la concentración del PGA y/o una disminución del tamaño del polímero.

Otra forma de caracterizar el comportamiento reológico de un fluido, específicamente el comportamiento viscoelástico, es mediante ensayos reológicos dinámicos, en donde se aplica una velocidad de deformación sobre un fluido, obteniendo como respuesta la amplitud del esfuerzo cortante y la deformación del fluido. Este tipo de ensayo permite determinar la proporción entre el componente elástico y viscoso de un material y cuantificar en qué medida se comporta como un sólido o un líquido (Ramos e Ibarz, 2006).

Las propiedades viscoelásticas son determinadas mediante el módulo elástico o de almacenamiento de energía (G') y el módulo viscoso o de pérdida de energía (G''). Cuando $G' > G''$, el material presenta características más elásticas, es decir, un comportamiento semisólido; en el caso en que $G'' > G'$, el material presenta características más viscosas o un comportamiento semilíquido.

En la Figura 4.8 se muestran los módulos de elasticidad y viscosidad en función de la frecuencia para las 18 horas de la condición agitada a 250 rpm con 15 mL de V_{Llenado} ($VTO_{\text{máx}}=19$ mmol/L h). Se observó que los valores de G'' fueron mayores a los de G' , por lo que se concluye que predominó el carácter viscoso y la muestra se comportó más como un semilíquido. Dado que G'' se relaciona a la energía asociada a la disipación viscosa, un análisis riguroso del comportamiento viscoelástico del caldo de *B. velezensis* 83 podría ofrecer una explicación a los altos consumos de potencia discutidos en la Sección 4.4.

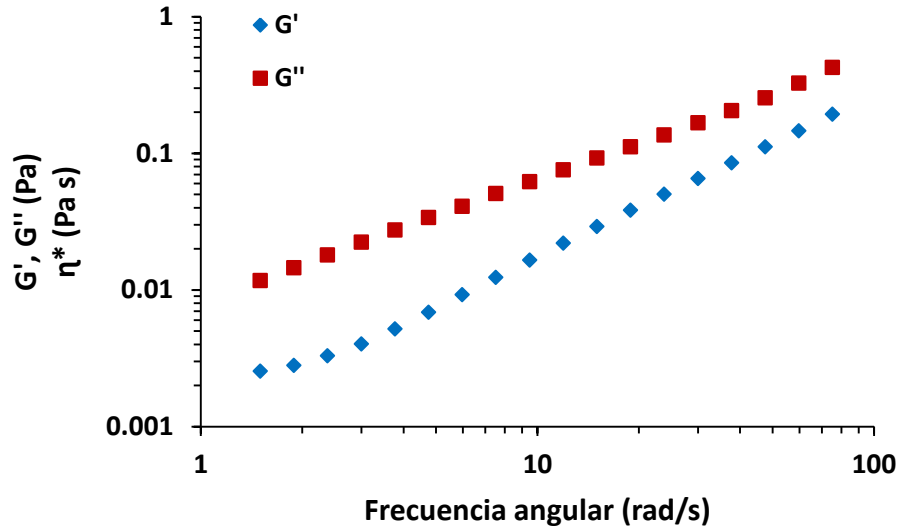


Figura 4.8. Valores de los módulos de almacenamiento (G') y de pérdida (G'') de energía en función de la frecuencia angular de un cultivo desarrollado a una $VTO_{m\acute{a}x}$ de 19 mmol/L h y de 18 horas de cultivo.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo contribuyen al entendimiento de la actividad respiratoria de *B. velezensis* 83 y la influencia de la velocidad de transferencia de oxígeno sobre el metabolismo celular y las características del PGA sintetizado. Al mismo tiempo, fueron útiles para conocer la relación que existe entre la producción del PGA y el incremento en la viscosidad del caldo de cultivo, y a su vez el impacto que tiene sobre el consumo de potencia volumétrica.

CAPÍTULO 4

5. CONCLUSIONES

- A través de cambios en la velocidad de agitación y el volumen de llenado del matraz, fue posible evaluar el efecto de la velocidad de transferencia de oxígeno y el consumo de potencia sobre el crecimiento de *B. velezensis* 83 y sobre la producción y el peso molecular del ácido γ -poliglutámico producido.
- El incremento en la velocidad de transferencia de oxígeno favoreció el crecimiento celular y la producción del polímero, por lo que en condiciones de alta transferencia de oxígeno (17 y 19 mmol/L h), la bacteria utiliza preferentemente la fuente de carbono para el crecimiento celular y la síntesis del polímero. En contraste, en condiciones de baja transferencia de oxígeno (menores a 5.7 mmol/L h), la fuente de carbono es utilizada principalmente para la síntesis de acetoína y 2,3-butanodiol como metabolitos de reserva de carbono y energía.
- El máximo peso molecular del PGA fue diferente sólo para el cultivo desarrollado a 2.5 mmol/L h (2400 kDa), para el resto de las condiciones estuvo alrededor de 2850 kDa. Sin embargo, la disminución del peso molecular del polímero sí estuvo influenciada directamente por la VTO, mostrando una relación directa entre el incremento de la VTO y la depolimerización del PGA.
- El incremento en el consumo de la potencia volumétrica mostró estar fuertemente influenciado por el incremento en la viscosidad del caldo de cultivo. A su vez, la viscosidad del caldo de cultivo estuvo determinada por la concentración del PGA.
- El PGA producido por *B. velezensis* 83, le confiere al caldo de cultivo características pseudoplásticas y viscoelásticas.

6. PERSPECTIVAS

- Para incrementar la producción del PGA es interesante evaluar estrategias como la adición de compuestos precursores del PGA como el ácido glutámico y el glicerol. Así mismo, se recomienda la evaluación del enriquecimiento del medio de cultivo con compuestos inductores de la producción del polímero como el salicilato de metilo y el benzoato de metilo.

7. REFERENCIAS

Alam, S., Capit, F., Weigandg, W.A. y Hong, J. 1990. Kinetics of 2,3-Butanediol fermentation by *Bacillus amyloliquefaciens*: Effect of initial substrate concentration and aeration. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology.** 47, 71-84.

Anderlei, T. y Büchs, J. 2001. Device for online measurement of the oxygen transfer rate in shaking flasks. **Biochemical Engineering Journal.** 7, 157-162.

Bajaj, I. y Singhal, R. 2010. Effect of aeration and agitation on synthesis of poly(γ -glutamic acid) in batch cultures of *Bacillus licheniformis* NCIM 2324. **Biotechnology and Bioprocess Engineering.** 15, 635-640.

Bajaj, I y Singhal, R. 2011. Poly (glutamic acid) – An emerging biopolymer of commercial interest. **Bioresource Technology.** 102, 5551-5561.

Biswas, R., Yamaoka, M., Nakayama, H., Kondo, T., Yoshida, K., Blsaria, V.S. y Kondo, A. 2012. Enhanced production of 2,3-butanediol by engineered *Bacillus subtilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology.** 94, 651–658.

Büchs, J. 2001. Introduction to advantages and problems of shaken cultures. **Biochemical Engineering Journal.** 7, 91-98.

Büchs, J., Maier, U., Milbradt, C. y Zoels, B. 2000a. Power consumption in shaking flasks on rotary shaking machines: I. Power consumption measurement in unbaffled flasks at low liquid viscosity. **Biotechnology and Bioengineering.** 68, 589-593.

Büchs, J., Maier, U., Milbradt, C. y Zoels, B. 2000b. Power consumption in shaking flasks on rotatory shaking machines: II. Nondimensional description of specific power consumption and flow regimes in unbaffled flasks at elevated liquid viscosity. **Biotechnology and Bioengineering.** 68, 594-601.

Candela, T., Moya, M., Haustant, M. y Fouet, A. 2009. *Fusobacterium nucleatum*, the first Gram-negative bacterium desmostrated to produce polyglutamate. **Canadian Journal of Microbiology.** 55, 627-632.

Celinska, E. y Grajek, W. 2009. Biotechnological production of 2,3-butanediol. Current state and prospects. **Biotechnology Advances.** 27, 715-725.

Cristiano, S.A. 2012. Estrategias de cultivo en lote y lote alimentado para el crecimiento vegetativo y la producción de esporas de *Bacillus subtilis* 83. Tesis de Maestría en Ciencias. **Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.**

Cromwick, A.M., Birrer, G.A. y Gross, R.A. 1996. Effects of pH and aeration on γ -poly(glutamic acid) formation by *Bacillus licheniformis* in controlled batch fermentor cultures. **Biotechnology and Bioengineering**. 50, 222 – 227-

Flores, C. 2014. Expresión de genes involucrados en la polimerización del alginato y actividad depolimerasa en función del oxígeno disuelto y su relación con el peso molecular del alginato producido por *Azotobacter vinelandii*. Tesis de Doctorado en Ciencias. **Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México**.

Galindo, E. 2013. El quehacer de la ciencia experimental. Una guía práctica para investigar y reportar resultados en las ciencias naturales. **Grupo Editorial Siglo Veintiuno**. 1ª edición.

Galindo, E., Carillo-Fasio, J.A., García, R., Patiño-Vera, M., 2005. Tecnología para el control biológico de la principal enfermedad del mango (antracnosis) y el efecto en su calidad poscosecha. **Claridades Agropecuarias**. 148, 50-59.

García-Ochoa, F., Gomez, E., Santos, V.E. y Merchuk, J.C. 2010. Oxygen uptake rate in microbial processes: An overview. **Biochemical Engineering Journal**. 49, 289-307.

Giese, H., Azizan, A., Kümmel, A., Liao, A., Peter, C.P., Fonseca, J.A., Hermann, R., Duarte, T.M. y Büchs, J. 2013. Liquid films on shake flask wall explain increasing maximum oxygen transfer capacities with elevating viscosity. **Biotechnology and bioengineering**. 111, 295-308.

Gómez Pazarín, K.D. 2015. Capacidad viscosificante del alginato producido por *Azotobacter vinelandii* en cultivos en matraces agitados sometidos a bajos consumos de potencia. Tesis de Maestría en Ciencias. **Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México**.

Guez, J.S., Müller, C.H., Danze, P.M., Büchs, J. y Jacques, P. 2008. Respiration activity monitoring system (RAMOS), an efficient tool to study the influence of the oxygen transfer rate on the synthesis of lipopeptide by *Bacillus subtilis* ATCC6633. **Journal of Biotechnology**. 134, 121-126.

Hezayen, F.F., Rehm, B.H., Tindall, B.J. y Steinbuche, A. 2001. Transfer of *Natrialba asiática* B1T to *Natrialba taiwanensis* sp. nov. and description of *Natrialba aegyptiaca* sp. nov., a novel extremely halophilic, aerobic, non-pigment member of the Archea from Egypt that produces extracellular poly(glutamic acid). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 51, 1133-1142.

Hu, J., Lei, P., Mohsin, A., Liu, X., Huang, M., Li, L., Hu, J., Hang, H., Zhuang, Y. y Guo, M. 2017. Mixomics analysis of *Bacillus subtilis*: effect of oxygen availability on riboflavin production. **Microbial Cell Factories**. 16(1):150.

Hsueh, Y.H., Huang, K.Y., Kunene, S.C. y Lee, T.Y. 2017. Poly- γ -glutamic acid synthesis, gene regulation, phylogenetic relationship, and role in fermentation. **International Journal of Molecular Sciences**. 18, 2644-2664.

- Klöckner, W. y Büchs, J. 2011. Shake-flask bioreactors. **Comprehensive Biotechnology**. Second edition. 2, 213-226.
- Leonard, C.G., House, R.D. y Thorne, C.B. 1958. Effects of some metallic ions on glutamyl polypeptide synthesis by *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**. 76, 499-503.
- Lowry, OH., Rosenbrough, NJ., Lewis, A., Farr, S. y Randall. RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry** 193:265–75 (1951).
- Luo, Z., Guo, Y., Liu, J., Qiu, H., Zhao, M., Zuo, W. y Li, S. 2016. Microbial synthesis of poly-glutamic acid: current progress, challenges, and future perspectives. **Biotechnology for Biofuels**. 9, 134-146.
- Magee, R.J. y Kosaric, N. 1987. The microbial production of 2,3-butanediol. **Advances in applied microbiology**. 32, 89-161.
- Maier, U. y Büchs, J. 2001. Characterization of the gas-liquid mass transfer in shaking bioreactors. **Biochemical Engineering Journal**. 7, 99-106.
- Mallqui, Y.L. 2016. Efecto de la densidad celular en la esporulación de la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* 83. Tesis de Maestría en Ciencias. **Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México**.
- McDaniel, L.E. y Bailey, E.G. 1969. Effect of shaking speed and type of closure on shake flask cultures. **Applied Microbiology**. 17, 286-290.
- Meissner, L., Kauffmann, K., Wengeler, T., Mitsunaga, H., Fukusaki, E. y Büchs, J. 2015. Influence of nitrogen source and pH value on undesired poly(γ -glutamic acid) formation of a protease producing *Bacillus licheniformis* strain. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. 42, 1203-1215.
- Meissner, L., Arndt, J., Palmen, T., Jestel, T., Mitsunaga, H., Fukusaki, E. y Büchs, J. 2017. Investigation of poly(γ -glutamic acid) production via online determination of viscosity and oxygen transfer rate in shake flask. **Journal of Biological Engineering**. 11:23.
- Nakano, M.M. y Hulett, F.M. 1997. Adaptation of *Bacillus subtilis* to oxygen limitation. **Microbiology Letters**. 157, 1-7.
- Ogunleye, A., Bhat, A., Irorere, V.U., Hill, D., Williams, C. y Radecka, I. 2015. Poly- γ -glutamic acid: production, properties and applications. **Microbiology**. 161, 1-17.
- Ortíz, L. 2017. Estudio de la velocidad de transferencia de oxígeno y consumo de potencia en el cultivo de *Pleurotus ostreatus* CP50 para producción de lacasas en matraces agitados. Tesis de Licenciatura en Ingeniería en Biotecnología. **Universidad Politécnica del Valle de Toluca**.
- Peña, C., Peter, C., Büchs, J. y Galindo, E. 2007. Evolution of the specific power consumption and oxygen transfer rate in alginate-producing cultures of *Azotobacter vinelandii* conducted in shake flasks. **Biochemical Engineering Journal**. 36, 73-80.

Peter, C., Suzuki, Y., Ranchiskiy, K., Lotter, S. y Büchs, J. 2006. Volumetric power consumption in baffled shake flasks. **Chemical Engineering Science**. 61, 3771-3779.

Pliego, M. 2014. Montaje, validación y caracterización de un equipo para medir el consumo de potencia en línea en cultivos en matraces agitados. Tesis de Licenciatura en Ingeniería química. **Universidad Autónoma del Estado de Morelos**.

Ramos, A. y Ibarz, A. 2006. Comportamiento viscoelástico de pulpa de membrillo en función de la concentración de sólidos solubles. **Ciencia y tecnología de alimentos**. 26, 214-219.

Richard, A. y Margaritis, A. 2002. Production and mass transfer characteristics of non-newtonian biopolymers for biomedical applications. **Critical Reviews in Biotechnology**. 22, 355-374.

Richard, A. y Margaritis, A. 2003. Rheology, oxygen transfer, and molecular weight characteristics of poly (glutamic acid) fermentation by *Bacillus subtilis*. **Biotechnology and Bioengineering**. 82, 299-305.

Shih, I. y Van, Y. 2001. The production of poly-(gamma-glutamic acid) from microorganisms and its various applications. **Bioresource Technology**. 79, 207-225.

Siebring, J., Elema, M., Vega, F., Kovács, A., Haccou, P. y Kiupers, O. 2014. Repeated triggering of sporulation in *Bacillus subtilis* selects against a protein that affects the timing of cell division. **Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology**. 8, 77-87.

Sirisansaneeyakul, S., Cao, M., Kongklom, N., Chuensangjun, C., Shi, Z. y Cristi, Y. 2017. Microbial production of poly- γ -glutamic acid. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 33, 173-181.

Solis, Y. 2010. Identificación parcial de antibióticos ciclilipopeptídicos termorresistentes producidos por *Bacillus subtilis* 83 con actividad antifúngica contra *Fusarium spp.* Tesis de Licenciatura en Ingeniería Química. **Universidad Autónoma del Estado de Morelos**.

Soriano, E. 2016. Efecto de la limitación nutricional en la esporulación de *Bacillus amyloliquefaciens* 83. Tesis de Maestría en Ciencias. **Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México**.

Suresh, S., Srivastava, V. y Mishra, I. 2009. Critical analysis of engineering aspects of shaken flasks bioreactors. **Critical Reviews in Biotechnology**. 29, 225-278.

Syu, M.J. 2001. Biological production of 2,3-butanediol. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 55, 10-18.

Tanimoto, H., Fox, T., Eagles, J., Sathot, H., Nozawa, H., Okiyama, A., Morinaga, Y., Susan, J. y Fairweather-Tait, S. 2007. Acute effect of poly-glutamic acid on calcium absorption in post-menopausal women. **The Journal or the American College of Nutrition**. 26, 645-649.

Troy, F.A. 1973. Chemistry and biosynthesis of the poly(γ -D-glutamyl) capsule in *Bacillus licheniformis*: 2. Characterization and structural properties of the enzymatically synthesized polymer. **Journal of Biological Chemistry**. 248, 316-324.

Wilmington, A., Begemann, J., Kuhne, S., Regestein, L., Bongaerts, J, Evers. S., Maurer, K.H. y Büchs, J. 2013. Metabolic studies of γ -poliglutamic acid production in *Bacillus licheniformis* by small-scale continuous cultivations. **Biochemical Engineering Journal**. 73, 29-37.

Xiao, J., Shi, Z., Gao, P. y Feng, H. 2006. On-line optimization of glutamate production based on balance metabolic control by RQ. **Bioprocess and Biosystems Engineering**. 29, 109-117.

8. ANEXOS

Anexo 1. Valores de torque en la calibración de las diferentes condiciones de cultivo para la determinación del consumo de potencia.

Tabla 8.1. Valores de torque de calibración para cada condición de cultivo desarrollada en el presente trabajo.

Condiciones		Torque de referencia (N cm)
V _{Llenado} (mL)	Agitación (rpm)	
50	100	17.17 ± 0.17
	200	25.44 ± 0.29
15	200	26.49 ± 0.51
	250	27.61 ± 0.24