

PRODUCCIÓN Y RECUPERACIÓN DE P(3HB) DE ULTRA-ALTO PESO MOLECULAR EN CULTIVOS LOTE ALIMENTADO USANDO LA CEPA OPNA DE *Azotobacter vinelandii*

Andrés García; Diana Pérez, Manuel Castro, Jorge Sánchez, Tania Castillo, Carlos Peña; Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología-UNAM, Cuernavaca, Morelos, C.P. 62210 México; E-mail: carlosf@ibt.unam.mx

Palabras clave: Escalamiento, P(3HB), Peso molecular

Introducción. El poli-3-hidroxitubirato P(3HB) es un bioplástico producido por la bacteria *Azotobacter vinelandii* que se caracteriza por su biodegradabilidad y biocompatibilidad; este biopolímero tiene alto interés biotecnológico y comercial, lo cual depende de sus propiedades químicas particularmente de su peso molecular (1). Se han buscado diversas estrategias de cultivo celular que permiten obtener P(3HB) de manera eficiente, reduciendo los costos de producción (2) y de igual manera métodos para la separación del producto sin afectar las propiedades químicas del polímero (3).

Por ello, el objetivo de este estudio fue desarrollar un proceso de producción y recuperación de P(3HB) a escala piloto, basado en el uso de cultivos lote alimentado, acoplado a un método de recuperación utilizando disolventes no halogenados (etanol y acetona).

Metodología. Se utilizó la cepa mutante OPNA de *A. vinelandii* (4). Los cultivos lote alimentados a escala de 3 L se realizaron sin control de oxígeno disuelto, usando sacarosa y extracto de levadura grado industrial a una relación de carbono/nitrógeno (C/N) de 14, el pH fue controlado mediante la adición automática de NaOH (6N) y HCl (3N). Se empleó una agitación de 500 rpm en la etapa lote y se incrementó a 700 rpm en la etapa de alimentación. Para los cultivos a 30 L se tomó como criterio de escalamiento la potencia volumétrica gaseada (P_g/V) donde se reprodujo los valores calculados a partir de los cultivos a 3 L. Para la extracción de P(3HB), la suspensión celular de biomasa y etanol se calentó a 77 °C para posteriormente realizar lavados con etanol-acetona 1:1 y finalmente secar el pellet a temperatura ambiente. La producción y peso molecular del P(3HB) se cuantificó de acuerdo a lo descrito previamente (5).

Resultados. En los cultivos realizados a 3 L bajo condiciones de limitación de oxígeno y adicionando dos pulsos de nutrientes (23 y 37 h) fue posible alcanzar una concentración de $29 \pm 4.5 \text{ g L}^{-1}$ de P(3HB), lo cual representó una acumulación del 78 % con respecto a la biomasa total. La productividad promedio del proceso fue de $0.54 \text{ g}_{P(3HB)} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Al escalar el proceso a un nivel de 30 L se usó una agitación de 266 rpm en la etapa lote y 373 rpm en la etapa de alimentación para reproducir el consumo de potencia ($0.32\text{-}0.88 \text{ kW m}^{-3}$) calculada en los fermentadores de 3 L. En general, se observó una tendencia similar en los cultivos a 30 L, alcanzándose una producción de $34 \pm 4.5 \text{ g L}^{-1}$ de P(3HB) después de las 56 h de cultivo, lo cual representa el 82 % de acumulación del polímero (Fig. 1). La productividad del proceso a 30 L fue de $0.70 \text{ g}_{P(3HB)} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. En cuanto a la extracción del P(3HB) se obtuvo un rendimiento del 85 % y una pureza del 95 % al final de los cultivos a 30 L. Asimismo, el peso molecular del polímero fue de $5693 \pm 615 \text{ kDa}$, el cual fue mayor en comparación con el proceso de extracción convencional cuando se utiliza hipoclorito de sodio y cloroformo, donde se obtuvo un peso molecular de 547 kDa (Fig. 2).

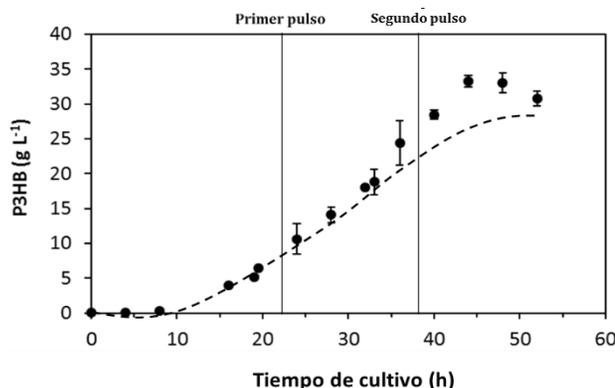


Fig. 1. Comparación de la evolución de la producción de P(3HB) en cultivos con la cepa OPNA de *A. vinelandii* en biorreactor de 3 L (línea discontinua) y 30 L (símbolos negros) usando perfiles de consumo de potencia equivalentes.

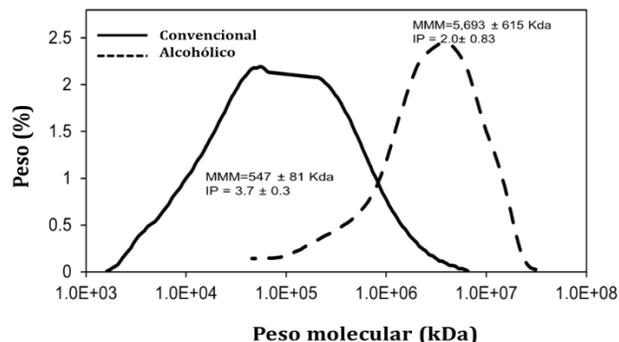


Fig. 2. Comparación de la distribuciones de peso molecular en cultivos con la cepa OPNA de *A. vinelandii* usando el método alcohólico (--) y el método convencional (—).

Conclusiones. Fue posible establecer un proceso de producción y recuperación de P(3HB) a escala de 30 L para la obtención de un bioplástico de alta pureza y de ultra-alto peso molecular.

Agradecimientos. Se agradece el apoyo del proyecto DGAPA/UNAM (IT200216).

Bibliografía.

- Peña C, Castillo T, García A, Segura D (2014) *Microb Biotechnol* 7: 278–293.
- Castillo T, Flores C, Segura D, Espín G, Sanguino J, Cabrera E, Barreto J, Díaz-Barrera A, Peña C (2017) *J Chem Technol Biotechnol* 92: 1809–1816.
- Aramvash A, Gholami-Banadkuki N, Seyedkarimi MS (2016) *Biotechnol Prog* 32: 1480–1486.
- García A, Segura D, Espín G, Galindo E, Castillo T, Peña C (2014) *Biochem Eng J* 82:117–123.
- Millán M, Segura D, Galindo E, Peña C (2016) *Proc Biochem* 51: 950–958.

