



## “INFLUENCIA DE LA RELACIÓN C/N SOBRE EL PESO MOLECULAR DEL POLI-3-HIDROXIBUTIRATO (PHB) SINTETIZADO POR LA CEPA OPNA DE *Azotobacter vinelandii*”

Jasmin Barreto<sup>1</sup>, Tania Castillo<sup>3</sup>, Daniel Segura<sup>2</sup>, y Carlos F. Peña<sup>1\*</sup>. Instituto de Biotecnología, UNAM.

Dpto. Ingeniería Celular y Biocatálisis. <sup>2</sup>Depto. de Microbiología Molecular. <sup>3</sup>UAEM. Centro de Investigaciones en Biotecnología. Cuernavaca, Morelos México. e-mail: jasmin\_baal@hotmail.com

*Palabras clave:* peso molecular, PHB, *Azotobacter vinelandii*

**Introducción.** El polihidroxibutirato (PHB) es un polímero intracelular de la familia de los polihidroxicanoatos. El PHB tiene propiedades termo-mecánicas comparables a las del polipropileno, con la ventaja de que es un polímero biocompatible y biodegradable. Este polímero es acumulado por *Azotobacter vinelandii* como material de reserva de carbono y energía en forma de gránulos intracelulares<sup>1</sup>. Las propiedades termo-mecánicas de este polímero dependen principalmente del peso molecular promedio (PMP)<sup>1</sup>. Se han diseñado estrategias para mejorar la producción de PHB de alto peso molecular, a través de la manipulación genética y modificaciones en los parámetros de cultivo. Entre las variables de cultivo que se ha observado en otras especies bacterianas, influyen en la producción del PHB, se encuentra la relación carbono-nitrógeno (C/N)<sup>2</sup>. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la relación C/N sobre el peso molecular del PHB producido por la cepa OPNA de *A. vinelandii*.

**Metodología.** Se realizaron, por triplicado, cultivos lote de la cepa OPNA de *A. vinelandii*<sup>3</sup>. Los cultivos se llevaron a cabo en un fermentador de 3 L a un pH de 7.2, 29°C, 500 rpm y una aireación de 0.5 vvm. Como medio de cultivo se empleó sacarosa (20 g L<sup>-1</sup>) y extracto de levadura. Se evaluaron 3 condiciones C/N: 10, 18 y 60, con 14, 6.5 y 1.6 g L<sup>-1</sup> de extracto de levadura, respectivamente. Se realizó el seguimiento del crecimiento mediante la cuantificación de proteína total (Lowry) y se cuantificó producción de PHB por HPLC<sup>3</sup>. La determinación del peso molecular del PHB se llevó a cabo mediante cromatografía de filtración en gel (GPC/HPLC)<sup>4</sup>.

**Resultados.** Entre las condiciones C/N = 10 y C/N = 18 no se observaron diferencias significativas en el crecimiento celular (Fig.1) con concentraciones máximas de proteína de 0.57 ± 0.13 y 0.60 ± 0.06 g L<sup>-1</sup>, respectivamente. Sin embargo, en la condición C/N = 60 se afectó negativamente el crecimiento, alcanzándose una concentración de proteína máxima de 0.31 ± 0.10 g L<sup>-1</sup>, como un reflejo de la limitación por nitrógeno presente en esta condición. No obstante, el contenido de PHB (% g g<sub>bio</sub><sup>-1</sup>) para las tres condiciones evaluadas fue en promedio de 80.8 ± 1.3. En lo que se refiere al PMP del PHB (Fig. 2), este fue mayor (6585 ± 784 kDa) en la condición C/N = 18 durante la fase estacionaria; en

contraste, el peso molecular más bajo se obtuvo en la condición C/N = 10 (2599 ± 682 kDa) y permaneció constante en las dos etapas del cultivo.

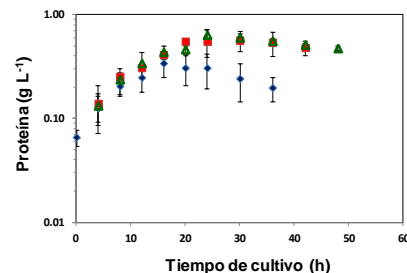


Fig 1. Cinética de crecimiento: C/N = 10 (■), C/N = 18 (▲) y C/N = 60 (◆)

Lo cual sugiere que la relación C/N tiene un papel relevante en el proceso de polimerización del PHB.

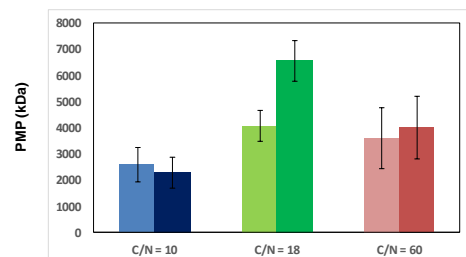


Fig 2. Peso molecular promedio del PHB bajo diferentes relaciones C/N en fase exponencial (colores claros) y en fase estacionaria (colores oscuros).

**Conclusiones.** Los cambios en la relación C/N en el medio de cultivo no afectaron el contenido de PHB con respecto a la biomasa total. En contraste, el PMP de este polímero fue mayor en la condición C/N=18, debido a que en esta condición la relación C/N podría favorecer el proceso de polimerización del PHB.

**Agradecimiento.** DGAPA – PAPIIT a través del proyecto IT100513.

### Bibliografía.

1. Peña C., Castillo T., García A., Millán M. and Segura D. (2014). *Microbiol. Biotechnol.* 7(4): 278-293.
2. Quagliano J. and Miyazaki S. (1997) *Appl. Microbiol Biotechnol.*48(5):662-664
3. García A., Segura D., Espín G., Galindo E., Castillo T. and Peña C. (2014) *Biochem Eng J.* 82: 117-123.
4. Peña C., López S., García A., Espín G., Romo-Uribe A. and Segura D., (2014) *Annals Microbiol.* 64(1): 39-47.