

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA



Casa abierta al tiempo

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA

ESTUDIO DE LA DEGRADACIÓN DE METANO Y ACUMULACIÓN DE POLÍMEROS INTRACELULARES POR *Methylobacterium organophilum* CZ-2

T E S I S

para obtener el grado de

Doctora en Biotecnología

P R E S E N T A

M en B Nancy Cristal Zúñiga Peña

Comité Tutorial:

Director: Dr. Sergio Revah Moiseev

Asesor: Dra. Marcia Morales Ibarría

Asesor: Dr. Alvaro Raúl Lara Rodríguez

Fecha

28 de enero 2014

**“El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana
está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del
CONACYT, con la referencia 001466”**

México D.F. a 28 de enero del 2014

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

ESTUDIO DE LA DEGRADACIÓN DE METANO Y ACUMULACIÓN DE POLÍMEROS
INTRACELULARES POR *Methyobacterium organophilum* CZ-2.

que presentó

M en B Nancy Cristal Zúñiga Peña

Comité Tutorial:

Director: Dr. Sergio Revah Moiseev

Asesor: Dra. Marcia Morales Ibarría

Asesor: Dr. Alvaro R Lara Rodríguez

Jurado:

Presidente: Dr. Juan Silvestre Aranda Barradas

Secretario: Dr. Oscar Armando Monroy Hermosillo

Vocal: Dr. Luciano Aguilera Vázquez

Vocal: Dr. Roberto Olivares Hernandez

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios y a mi familia por infundir en mí las ganas de estudiar, trabajar y superarme cada día, también por su apoyo incondicional durante el tiempo que he estado lejos.

Al Dr. Sergio Revah por haber permitido la realización de este trabajo en el Laboratorio de Emisiones Gaseosas de la UAM-Iztapalapa y en el laboratorio de Procesos y Tecnología de la UAM-Cuajimalpa; gracias por todos los recursos económicos e intelectuales invertidos durante mi formación, espero que algún día yo pueda contribuir en el aprendizaje de alguien como usted y la Dra. Marcia Morales han hecho conmigo, siempre acompañándome y respaldando la toma de decisiones muy importantes en mi vida.

Al Dr. Luciano Aguilera y al Dr. Sergio Bordel por sus asesorías y aportes a lo largo del proyecto.

A José Rocha Ríos por su colaboración durante el desarrollo de esta tesis.

A CONACYT por el apoyo económico que me permitió realizar mis estudios.

Al Dr. Juan Aranda, Dr. Oscar Monroy y Dr. Roberto Olivares por la revisión de este documento.

A mis compañeros y amigos del laboratorio W-107 y la PPU4, en especial a los futuros doctores Alma Toledo, Juan Cabello, Luis Arellano, Leon Sanchez, Teresa Garcia y Sergio Hdez.

RESUMEN

Las emisiones de gases que contribuyen al calentamiento global son un grave problema para la humanidad y los ecosistemas debido a sus efectos sobre el cambio climático. Durante las últimas décadas, el crecimiento demográfico y el desarrollo industrial han dado lugar a la acumulación de gases como el dióxido de carbono (CO₂), metano (CH₄) y óxido nitroso (N₂O), que contribuyen al efecto de invernadero. El CH₄ tiene un potencial global de calentamiento (PGC), que es de 21 a 75 veces mayor que el CO₂ dependiendo del tiempo de referencia considerado.

El CH₄ es un gas de efecto invernadero, cuya concentración promedio en la atmósfera es de alrededor de 1760 ppbv. La degradación biológica de CH₄ ha sido estudiada en reactores de tanque agitado, biofiltros, biocubiertas y, recientemente, en reactores de membrana y reactores de partición de dos fases líquidas (TPPB), estos últimos tienen como característica una fase no acuosa adicional, como aceite de silicón o hexadecano, que aumenta la biodisponibilidad de CH₄ mediante la mejora en los procesos de transferencia de masa del sustrato en la fase gaseosa hacia los microorganismos en el medio de cultivo.

En este trabajo, se estudió la degradación de CH₄ por *Methylobacterium organophilum* CZ-2, una cepa aislada de un consorcio metanotrófico; se ensayaron diferentes condiciones de operación; crecimiento y limitación por nitrógeno utilizando reactores de tanque agitado (STR) y TPPB, con el fin de estudiar tanto el efecto del aceite de silicón sobre la degradación de CH₄ como la acumulación de polímeros intracelulares, la cepa aislada mostró mayor capacidad de degradación de CH₄ bajo condiciones de crecimiento y aumento el 33 % la degradación en el TPPB.

Aunado a esto se realizó un modelo metabólico donde se estudió el metabolismo metanotrófico de *Methylobacterium organophilum* CZ-2, que involucra la mineralización de CH₄, el ciclo de la serina, el ciclo de los ácidos tricarbónicos, la ruta del etilmalonil-CoA, la síntesis de PHA de cadena par e impar, principalmente; el objetivo de esta parte del trabajo fue evaluar la factibilidad metabólica de utilizar diferentes cosustratos que permitan alcanzar mayores cantidades de biomasa y PHA de mayor calidad; el modelo se validó y permitió hacer algunas simulaciones *in silico* que teóricamente permitirán redirigir el flujo de carbono hacia la síntesis de polímeros intracelulares con diferentes monómeros.

Los cosustratos seleccionados, después del análisis metabólico, fueron citrato y propionato; y estos se probaron en experimentos en matraces con mezclas de

sustratos CH₄-citrato y CH₄-propionato los valores de y_{PHA} fueron 0.82 y 0.68, respectivamente. Cuando *M. organophilum* CZ-2 se cultivó en bioreactores con CH₄-citrato la concentración final de PHA fue de 143 g m⁻³, el cual contenía monómeros de hidroxibutirato (HB), hidroxivalerato (HV) y hidroxioctanoato (HO), en proporciones de 55:35:10, con y_{PHA} de 0.88 y conservando la capacidad de eliminación (CE) de CH₄ en 20 g m⁻³ h⁻¹. Para el caso de CH₄-propionato, el y_{PHA} fue de 0.3 y la CE estuvo alrededor de 8 g m⁻³ h⁻¹.

El polímero producido fue caracterizado por espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) y calorimetría diferencial de barrido (DSC), en la RMN de ¹H y ¹³C se encontró que el polímero producido con la mezcla de sustratos CH₄-citrato contenía seis monómeros diferentes: 3HB, 3HV, 4HV, 4-hidroxioheptanoato (4HH), 3HO y 4HO, los cuales muestran la versatilidad de esta bacteria para producir PHA de alta calidad reflejada en sus propiedades físicas y mecánicas. En cuanto al DSC, se obtuvieron valores de temperatura de fusión similares a los obtenidos en la literatura, para el caso de CH₄ como única fuente de carbono la composición del polímero fue 95:5 PHB-V y la temperatura de fusión de 165°C, para la mezcla de CH₄-propionato de composición 75:25 PHB-V fue de 148°C y finalmente cuando se adicionó CH₄-citrato de composición 55:34:11 PHB-V-O fue de 118°C.

Estos resultados son comparables y en el caso de acumulación superiores a los reportados en la literatura. Lo ensayado demostró que durante el tratamiento de CH₄ es posible generar un producto con alto valor agregado, siempre y cuando las condiciones de cultivo permitan redirigir el metabolismo celular hacia la producción de PHA y biomasa reduciendo las emisiones de CO₂.

ABSTRACT

The gas emissions contribute to the global warming are a serious problem for humanity and ecosystems due to its effects on climate change. During the last decades, population growth and industrial development have led the accumulation of gases such as carbon dioxide (CO₂), methane (CH₄) and nitrous oxide (N₂O), which contribute to the greenhouse effect. The CH₄ has a global warming potential (GWP), between 21 to 75 times greater than CO₂ depending on the timeframe considered.

In this work, the degradation of CH₄ by *Methylobacterium organophilum* CZ-2 was studied, this strain was isolated from a methanotrophic consortium, the bacterium was tested under different operating conditions; growth and nitrogen starvation in stirred tank reactors (STR) and TPPB; the effect of silicone oil on the degradation of CH₄ during the growth and the accumulation of intracellular polymers were analyzed, the isolated strain showed greater capacity for CH₄ elimination, in growth conditions the degradation increased 33 % in with the TPPB, while during the accumulation of polymers did not see any effect.

Added to this a metabolic model was reconstructed where the metabolism of *Methylobacterium organophilum* CZ-2 was represented, the main pathways involved are: CH₄ mineralization, serine cycle, tricarboxylic acid cycle, the ethylmalonyl-CoA pathway and the synthesis of PHA, mainly; the aim of this study was evaluate the feasibility for use different metabolic cosubstrates in order to reach greater concentrations of biomass and PHA content, trying to achieve a better polymer quality; the model was validated and used to do some analysis *in silico*, the results gave us some theoretical options to redirect the flow of carbon into the synthesis of polymers with different monomers.

The cosubstrates selected after the metabolic analysis were citrate and propionate and these were tested in experiments in mixtures CH₄-cosubstrates (citrate and propionate),

the PHA content (y_{PHA}) values were 0.82 and 0.68, respectively. When *M. organophilum* CZ-2 was cultured in bioreactors with CH₄-citrate PHA final concentration was 143 g m⁻³, which contained monomers hydroxybutyrate (HB), hydroxyvalerate (HV) and hydroxyoctanoate (HO), in proportions of 55: 35:10, with y_{PHA} of 0.88 and preserving the elimination capacity in 20 g m⁻³ h⁻¹. In case of CH₄-propionate, the y_{PHA} was 0.3 and the CE was about 8 g m⁻³ h⁻¹.

The polymer produced was characterized by nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) and differential scanning calorimetry (DSC); in the NMR analysis of ¹H and ¹³C was found that the polymer produced with the substrate mixture of CH₄-citrate contained six different monomers: 3HB, 3HV, 4HV, 4-hydroxyheptanoate (4HH), 3HO and 4HO, showing that this bacterium can produce high quality PHA, which is reflected in their physical and mechanical properties. The DSC melting temperature values were similar to reported in the literature, for CH₄ as a sole carbon source the polymer composition by GC was 95:5 PHB-V and the melting temperature was 165 °C, for the mixture CH₄-propionate was 75:25 PHB-V and 148 °C, finally CH₄-citrate the composition was 55:34:11 PHB-V-O and melting temperature 118 °C.

These results are comparable with the reported in the literature, and in the case of PHA accumulation were higher. It was showed that during treatment of CH₄ is possible to generate a added value product, as long as growing conditions permit redirect cellular metabolism toward the production of PHA and biomass reducing CO₂ emissions.

Tabla de contenido

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Calentamiento Global	3
2.1.1 <i>El CH₄ un gas de efecto invernadero</i>	3
2.1.2 <i>Procesos donde se genera CH₄</i>	5
2.2 Métodos de tratamiento	6
2.2.1 <i>Procesos naturales</i>	7
2.2.2 <i>Métodos químicos y biológicos</i>	7
2.3 Métodos biológicos	9
2.3.1 <i>Biocubiertas y biofiltros</i>	9
2.3.2 <i>Reactores de partición de dos fases líquidas</i>	11
2.4 Microorganismos metanotróficos	13
2.4.1 <i>Fisiología y taxonomía</i>	13
2.4.2 <i>Bioquímica: Actividad metanotrófica, metano monooxigenasa (MMO)</i>	15
2.4.3 <i>Parámetros cinéticos de la oxidación de CH₄</i>	17
2.5 Subproductos generados de la degradación de CH ₄	17
2.5.1 <i>Polihidroxiclcanoatos (PHA)</i>	18
2.5.2 <i>Síntesis de PHA en bacterias metanotróficas y ventajas de la síntesis de copolímeros</i>	19
2.6 Biología de sistemas e Ingeniería metabólica (IM)	22
2.6.1 <i>Modelos estequiométricos</i>	26
2.6.1.1 <i>Aplicaciones de los modelos metabólicos a escala genoma (GEMM)</i>	27
2.6.1.2 <i>Solución de los GEMM a través del Análisis de Flujos Metabólicos (AFM)</i>	30
3.0 JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	32
3.1 Justificación	32
3.2 Objetivos	33
3.2.1 <i>Objetivo general</i>	33
3.2.2 <i>Objetivos particulares</i>	33
4. MATERIALES Y MÉTODOS	34
4.1 Aislamiento e identificación de las de cepas metanotróficas	35
4.1.1 <i>Microorganismos y medios de cultivo</i>	35
4.1.2 <i>Secuenciación del 16S rDNA y análisis filogenético</i>	35
4.2 Estudios en microcosmos	36
4.2.1 <i>Degradación de CH₄ y acumulación de PHA</i>	36

4.2.2 Consumo de cosustratos.....	37
4.3 Estudios en Bioreactores	37
4.3.1 Estudios de eliminación de CH ₄ y acumulación de PHA en reactores de partición de dos fases líquidas	37
4.3.2 Experimentos con adición de cosustratos	38
4.4 Métodos analíticos	38
4.4.1 Determinación de CH ₄ y CO ₂	38
4.4.2 Determinación de biomasa.....	38
4.4.3 Determinación de nitrógeno.....	38
4.4.4 Determinación de PHA.....	39
4.4.5 Resonancia Magnética Nuclear y Calorimetría.....	39
4.4.6 Determinación de cosustratos	40
4.5 Cálculos bioreactores.....	40
4.6 Modelo metabólico a escala genoma	41
4.6.1 Creando un borrador (Etapa 1).....	41
4.6.2 Reconstrucción manual y refinamiento (Etapa 2)	41
4.6.3 Convirtiendo la reconstrucción al modelo matemático (Etapa 3)	42
4.6.4 Evaluación de la ruta (Etapa 4)	43
5. RESULTADOS Y DISCUSION	47
5.1 Aislamiento, identificación, degradación de CH ₄ y acumulación de PHB en microcosmos y bioreactores.	47
5.1.1 Aislamiento de bacterias a partir del consorcio metanotrófico	47
5.1.2 Identificación del aislado CZ-2 y caracterización en microcosmos.....	47
5.1.3 Eliminación de CH ₄ por consorcio metanotrófico en biorreactores bajo condiciones de crecimiento o limitación por nitrógeno.....	49
5.1.4 Eliminación de CH ₄ y la acumulación de PHB por <i>M. organophilum</i> CZ-2 en biorreactores bajo condiciones de crecimiento y de limitación por nitrógeno.	51
5.1.5 Discusión.....	54
5.2 Experimentos con adición de cosustratos	57
5.2.1 Experimentos en microcosmos bajo condiciones de crecimiento.....	57
5.2.2 Experimentos de limitación de nitrógeno en microcosmos.....	59
5.2.3 Experimentos en bioreactores utilizando citrato y propionato como cosustratos	61
5.2.4 Caracterización estructural de los PHA por RMN y calorimetría	64
5.3 Modelo metabólico a escala del genoma de <i>Methylobacterium organophilum</i> CZ-2. 66	

5.3.1 Reconstrucción del modelo	66
5.3.2 Análisis de Shadow prices.....	68
5.3.3 Análisis energético y termodinámico	70
5.3.4 Comparación de las predicciones in silico con los resultados experimentales.	75
5.3.5 Análisis del plano de fase del consumo de CH ₄ y citrato.	76
6. CONCLUSIONES	78
6.1 Conclusión general	78
6.2 Conclusiones particulares	78
Referencias	80
Anexo 1. Ejemplo AFM red metabólica hipotética.....	91
Anexo 2. Listado de reacciones incluidas en el modelo.....	96
Anexo 3. Listado de enzimas.	103
Anexo 4. Lista de publicaciones y trabajos presentados durante el desarrollo de este trabajo.....	108

Índice de Figuras

Figura 2-1. Evolución de la concentración de CH ₄ en la atmósfera.	4
Figura 2-2. Fuentes de CH ₄ , origen antropogénico y fuentes naturales.	5
Figura 2-3. Configuraciones de biorreactores para el consumo de CH ₄	9
Figura 2-4. Intervalos de aplicación de métodos químicos y biológicos.	10
Figura 2-5. Representación de sistemas de dos fases.	12
Figura 2-6. Mineralización del CH ₄ .	15
Figura 2-7. Oxidación de CH ₄ en metanótrofos tipo I y II.	16
Figura 2-8. Degradación de CH ₄ y acumulación de PHB en metanótrofos Tipo I y II.	20
Figura 2-9. Ciclo para la describir un sistema biológico, usando IM	27
Figura 2-10. Reconstrucción de GEMM	30
Figura 4-1. Metodología, esquema general del proyecto.	34
Figura 5-1. Árbol filogenético metanótrofos.	48
Figura 5-2. Evolución de la capacidad de eliminación de la CE, la producción de CO ₂ y la tasa de degradación específica, q_{CH_4} , en el STR inoculado con el consorcio (n) y TPPB con aceite de silicona al 10% (Y).	49
Figura 5-3. La acumulación de PHB, la CE y la producción de CO ₂ en el STR inoculados con el consorcio.	50
Figura 5-4. Consorcio (líneas diagonales), <i>M. organophilum</i> CZ-2 (líneas verticales) en el STR.	51
Figura 5-5. CE (▲), la producción de CO ₂ (●) y la acumulación de PHB (n) como función del tiempo en el STR por <i>M. organophilum</i> CZ-2.	51
Figura 5-6. q_{CH_4} y acumulación de PHB, consorcio en el STR, <i>M. organophilum</i> CZ-2 en TPPB, <i>M. organophilum</i> CZ-2 en STR.	53

Figura 5-7. Experimentos en microcosmos limitados por nitrógeno, $X_T = X + \text{PHA}$	59
Figura 5-8. Capacidad de eliminación, CO_2 producido, NO_3 consumido y y_{PHA} alcanzado durante el experimento CH_4 -citrato.	61
Figura 5-9. Capacidad de eliminación, CO_2 producido, NO_3 consumido y y_{PHA} alcanzado durante el experimento CH_4 -propionato.	62
Figura 5-10. Caracterización del PHA producido con diferentes sustratos mediante RMN, A) CH_4 , B) CH_4 -propionato y C) CH_4 -citrato.	63
Figura 5-11. Ruta de degradación de CH_4 y cosustratos probados <i>in silico</i> .	66
Figura 5-12. Rendimientos respecto al flujo total de cada cosustrato (η), análisis de precios, síntesis de PHB (líneas horizontales), PHB-V-O (78:13-9) (líneas diagonales).	69
Figura 5-13. Almacenamiento de PHA por <i>M. organophilum</i> CZ-2.	71
Figura 5-14. Planos de fases de consumo de CH_4 y citrato	77
Figura A1-1. Principios de AFM, en una ruta metabólica hipotética.	91

Indice de Tablas

Tabla 2-1. Principales gases que contribuyen al efecto invernadero.	3
Tabla 2-2. Tecnologías químicas y biológicas para eliminar compuestos orgánicos presentes en efluentes gaseosos.	8
Tabla 2-3. Algunas características de las bacterias metanotróficas.	14
Tabla 2-4. Estructuras y PHA más comunes en la naturaleza.	21
Tabla 2-5. Ejemplos de IM con aplicación en bioremediación, síntesis de PHA y metabolismo de metilótrofos.	24
Tabla 4-1. Restricciones incluidas en el modelo.	44
Tabla 5-1. Tasa específica de consumo de CH ₄ y la capacidad de acumulación de PHB de <i>Methylobacterium organophilum</i> CZ-2 comparada con <i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b.	48
Tabla 5-2. Balances de carbono del consorcio y <i>M. organophilum</i> CZ-2, bajo las diferentes condiciones de operación experimentadas.	52
Tabla 5-3. Comparación de la productividad de PHB entre microorganismos degradadores de metano y metanol, por diferentes especies de <i>Methylobacterium</i> .	56
Tabla 5-4. Consumo de CH ₄ , O ₂ y cosustratos, producción de biomasa y CO ₂ en matraces cerrados cultivados durante 14 días.	57
Tabla 5-5. Resultados obtenidos en el calorímetro.	65
Tabla 5-6. Rendimiento de cada cosustrato y en mezcla con CH ₄ .	69
Tabla 5-7. Cantidad de ATP producido por cada mol de sustrato (Es) y monómeros de polímero.	71
Tabla 5-8. Energía almacenada en forma de polímeros, relación energía almacenada (Ea), energía del sustrato (Es).	72
Tabla 5-9. ΔG_r° de las reacciones de síntesis de PHB y PHA.	73

Tabla 5-10. Descripción de los experimentos realizados para validar el modelo	74
Tabla 5-11. Validación del modelo.	76
Tabla A2-1. Reacciones incluidas en el modelo.	96
Tabla A2-1. Enzimas.	103

Abreviaturas

ACM	Análisis de control metabólico
AFM	Análisis de Flujos Metabólicos
ATCC	American Type Culture Collection
BLP	Programación de dos niveles
CE	Capacidad de eliminación
CFC	Clorofluorocarburos
COV	Compuesto orgánico volátil
DMA	Análisis Mecánico Dinámico
DSC	Calorimetría de Barrido Diferencial
EC	Comisión de enzimas
ER	Eficiencia de remoción
FALDH	Formaldehído deshidrogenasa
FDH	Formiato deshidrogenasa
FTIR	Espectroscopía Infraroja Transformada de Fourier
GC	Cromatografía de gases
GEMM	Modelo Metabólico a Escala del Genoma
Gg	Gigagramos 10^9 gramos
GPC	Cromatografía de Permeabilidad en gel
H6PS	Hexulosa-6-fosfato sintasa
HPLC	Cromatografía Líquida de alta resolución
IPCC	Panel Intergubernamental para el Cambio Climático.

IM	Ingeniería metabólica
KEGG	Enciclopedia de genes y genomas Kyoto
LP	Programación lineal
MBR	Modelo Basado en Restricciones
mcl-PHA	Polihidroxialcanoatos de cadena media
MDH	Metanol deshidrogenasa
MILP	Programación lineal entera mixta
PHA	Polihidroxialcanoatos
PHB	Polihidroxibutirato
pMMO	Metano monoxigenasa particulada
ppbv	Partes por millón por volumen, $\mu\text{g m}^{-3}$
ppmv	Partes por millón por volumen, mg m^{-3}
pptv	Partes por trillón por volumen, ng m^{-3}
QP	Programación cuadrática
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
scl-PHA	Polihidroxialcanoatos de cadena corta
SF6	Hexafluoruro de azufre
sMMO	Metano monoxigenasa soluble
SthM	Serina hidroximetiltransferasa
STR	Reactor de tanque agitado
Tg	Teragramos, 10^{12} gramos
TGA	Análisis Termogravimétrico
TPPB	Reactores de partición de dos fases líquidas

Nomenclatura

ΔCO_2	CO ₂ producido a partir de CH ₄ , citrato o propionato (g m ⁻³)
ΔG_r°	Energía libre de Gibbs del cambio de todos los reactantes y productos en estado estandar considerados en la reacción (kJ mol ⁻¹)
ΔH	Entalpía (kJ mol ⁻¹)
ΔPHA	PHA producido a partir de CH ₄ , citrato o propionato (g m ⁻³)
ΔS	Sustrato consumido, puede referirse a CH ₄ , citrato o propionato (g m ⁻³)
ΔX	Biomasa producida a partir de CH ₄ , citrato o propionato (g m ⁻³)
b_i	Metabolito respecto al que se calcula el shadow price
C	Concentración (mmol L ⁻¹)
$C_{\text{CH}_4, \text{in}}$	Concentración de CH ₄ en la entrada (g m ⁻³)
$C_{\text{CH}_4, \text{out}}$	Concentración de CH ₄ en la salida (g m ⁻³)
$C_{\text{CO}_2, \text{in}}$	Concentración de CO ₂ en la entrada (g m ⁻³)
$C_{\text{CO}_2, \text{out}}$	Concentración de CO ₂ en la salida (g m ⁻³)
CE	Capacidad de eliminación
C_{ref}	Concentración de referencia (mmol L ⁻¹)
E_a	Energía almacenada en forma de polímero a partir de un mol de sustrato
E_s	Energía disponible en forma de ATP por mol de sustrato
PHA	Concentración de PHA (g m ⁻³)
Q	Caudal volumétrico (m ³ h ⁻¹)
q_{CH_4}	Tasa específica de consumo de CH ₄ (mg _{CH₄} g _X h ⁻¹)
q_{CO_2}	Tasa específica de producción de CO ₂ (mg _{CO₂} g _X h ⁻¹)
q_{PHA}	Tasa específica de producción de PHA (mg _{PHA} g _X h ⁻¹)
RE	Eficiencia de remoción (%)
T_m	Temperatura de fusión (°C)
V	Volumen de operación del reactor (m ³)
v	Tasa específica o actividad de la reacción (mmol g _X h ⁻¹)
X	Concentración de biomasa activa (g m ⁻³)

X_T	Concentración de biomasa total X+PHA (g m^{-3})
$Y_{\text{CO}_2,\text{S}}$	Coeficiente de rendimiento CO_2 respecto al sustrato
y_{PHA}	Fracción que representa el contenido de PHA
$Y_{\text{PHA},\text{S}}$	Coeficiente de rendimiento CO_2 respecto al sustrato
$Y_{\text{PHA},\text{X}}$	Coeficiente de rendimiento PHA respecto a la biomasa
$Y_{\text{X},\text{S}}$	Coeficiente de rendimiento de biomasa respecto al sustrato
Z	Función objetivo
α	Shadow price relativo
η	Relación entre la función objetivo (PHA) y la sumatoria de flujos
μ	Energía libre de Gibbs (kJ mol^{-1})
μ°	Energía libre de Gibbs en estado estandar (kJ mol^{-1})
π_i	Coeficiente Shadow price
ρ	Coeficiente estequiométrico que corresponde a los sustratos o productos presentes en la reacción.

1. INTRODUCCIÓN

El CH₄ es un contaminante atmosférico importante cuyo potencial global de calentamiento se ha reportado, dependiendo del tiempo de referencia considerado entre 25 y 72. El valor de 72 es ahora aceptado por el Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático (IPCC por sus siglas en inglés) como el más preciso para describir el impacto de CH₄ en la atmósfera (Goodland y Anhang, 2009). El CH₄ se produce abundantemente durante la extracción de petróleo, gas natural y la refinación de petróleo.

Debido a los costos de transporte y de almacenamiento, el CH₄ se suele quemar, teniendo así un efecto colateral que es la liberación de CO₂, otro gas de efecto invernadero considerado como el de mayor impacto. El CH₄ también se produce durante la degradación biológica de la materia orgánica por microorganismos metanogénicos en pantanos, arrozales, vertederos, producción animal intensiva y el tratamiento de aguas residuales (Goodland y Anhang, 2009).

Los procesos biológicos son opciones atractivas para el tratamiento de las emisiones de CH₄, cuando la concentración está por debajo del límite inferior de explosividad que es de 5 – 15 % v v⁻¹ en aire. El principal inconveniente del tratamiento biológico de CH₄ es su baja solubilidad en agua. Por lo tanto, se requieren tiempos de residencia altos para alcanzar un tratamiento adecuado. La biodegradación de CH₄ se ha aplicado *in situ* utilizando biocubiertas otras opciones incluyen la biofiltración y los reactores de tanque agitado. Recientemente, se han propuesto biorreactores de partición de dos fases como una alternativa para mejorar la eliminación de compuestos de baja solubilidad (Muñoz et al., 2007). Esta tecnología se basa en la adición de una fase orgánica inmisible, no degradable por los microorganismos que tiene mayor afinidad por el compuesto objetivo, solubilizando una mayor cantidad de compuesto. En cuanto a la eliminación de CH₄, la adición de 10 % (v v⁻¹) de aceite de silicón resultó en un aumento del porcentaje de remoción (ER) de 41 % en un consorcio metanotrófico (Rocha-Ríos et al., 2009). Sin embargo, los microorganismos estudiados no se cultivaron en condiciones de limitación de nutrientes, que puede estimular la producción de productos con valor agregado a partir de CH₄.

Las bacterias metanotróficas usan CH₄ como única fuente de carbono y energía, y algunas cepas pueden producir compuestos de alto valor agregado, como PHA. La producción de PHA a nivel industrial se realiza utilizando microorganismos, los cuales

usan comúnmente glucosa como fuente de carbono; aunque hoy en día se han realizado diferentes estudios donde se propone el uso de fuentes de carbono baratas o residuos industriales, como metanol, aceite de canola, etc. En este estudio se propone al CH₄ como una opción barata y ampliamente disponible en grandes volúmenes proveniente de fuentes fijas como la extracción gas natural, del biogás en las plantas de tratamiento de aguas residuales o residuo de la refinación del petróleo.

Los PHAs son poliésteres de origen natural producidos como materiales de almacenamiento de energía por diferentes bacterias. Estos poliésteres tienen propiedades similares a las del polipropileno y presentan características de termoplasticidad, biodegradabilidad, biocompatibilidad y piezoelectricidad interesantes y únicas. El biopolímero más estudiado dentro de los PHA es el polihidroxibutirato (PHB) y algunas bacterias lo acumulan cuando la fuente de carbono y energía está en exceso y hay limitación por nitrógeno principalmente.

En este trabajo se propone comparar la capacidad de un consorcio previamente adaptado al consumo de CH₄ (Rocha-Ríos et al., 2009) con una cepa aislada del mismo e identificada durante este trabajo (*Methylobacterium organophilum* CZ-2), en la etapa inicial se estudió la producción de PHB utilizando CH₄ como única fuente de carbono, en reactores de tanque agitado y reactores de partición de dos fases líquidas.

Posteriormente se construyó un modelo metabólico con base en el genoma de *Methylobacterium* que permitió realizar una selección racional de algunos cosustratos que metabólicamente propiciarían tanto la producción de una mayor cantidad de PHA, como variedad en el tipo de monómeros presentes en el polímero acumulado.

La tesis esta dividida en tres etapas: 1. El estudio del consorcio y la cepa aislada en diferentes tipos de reactores, 2. El trabajo experimental realizado con los cosustratos y 3. El desarrollo del modelo metabólico a escala del genoma, que se presenta junto con los principales fundamentos teóricos de todas las herramientas de ingeniería metabólica utilizadas.

2. ANTECEDENTES

2.1 Calentamiento Global

A partir de la revolución industrial en el siglo XVIII la concentración atmosférica de CO₂, CH₄ y N₂O ha excedido los valores que se dieron durante los 10,000 años previos. El incremento en la cantidad de los gases ha provocado la absorción y reemisión de radiación infrarroja entre la atmósfera y la superficie de la tierra, generando en el siglo XX, un aumento de la temperatura del planeta de aproximadamente 0.6 °C. Esta tendencia se ha atribuido a la acumulación de CO₂ y de otros gases en la atmósfera derivados de la actividad humana (Hansen y Makiko, 2001). Los principales compuestos que contribuyen al calentamiento global son CO₂ con 0.44 °C, el CH₄ con 0.2 °C, N₂O con 0.01 °C y CFC-11 & CFC-12 con 0.02 °C.

En la Tabla 2-1 se enlistan los principales gases del efecto invernadero y algunas de sus características.

Tabla 2-1. Principales gases que contribuyen al efecto invernadero (Khalil, 1999, IPCC, 2013).

Gases	Concentración		Velocidad de incremento (% por año)	Tiempo de decaimiento (año)	Contribución relativa al CO ₂ (Mol ⁻¹)	Contribución al efecto invernadero (%)
	Preindustrial	Presente (2011)				
CO ₂	280 ppmv	391 ppmv	0.5	250	1	60-70
CH ₄	700 ppmv	1803 ppbv	0.2-1	8-12	25	14-25
N ₂ O	240 ppmv	324 ppbv	0.3	120	298	8
SF ₆	0	7.28 pptv	0.27	3200	2 000	8
CFC-11	0	228 pptv	-1.3	50	12 000	4
CFC-12	0	528 pptv	4.6	100	15 000	8

2.1.1 El CH₄ un gas de efecto invernadero.

El CH₄ es el hidrocarburo más simple atómicamente y estable presente en la naturaleza y es el compuesto orgánico más abundante en la atmósfera. Su potencial global de calentamiento puede ser normalmente entre 21-25 y hasta 75 veces mayor que el del CO₂ dependiendo del tiempo de referencia considerado (Nikiema et al.,

2006; Goodland y Anhang, 2009), su vida media en la atmósfera es de 12 años y es muy poco soluble en H_2O con un coeficiente de partición de 33.5. El CH_4 está incluido en el Protocolo de Kyoto pero se le da más importancia al CO_2 . El Panel Intergubernamental sobre el Cambio Climático (IPCC por sus siglas en inglés) estima que es posible reducir el efecto del CH_4 sobre el calentamiento global en los próximos 50 años, siempre y cuando se apliquen nuevas tecnologías para la captación de CH_4 durante la extracción de petróleo, en los rellenos sanitarios, la minería, producción de gas y en las lagunas anaerobias de control de desechos. Una vez colectado el CH_4 puede transformarse mediante algún método químico o biológico (Hansen y Makiko, 2001). Las emisiones fugitivas de CH_4 en México fueron de 14,211 Gg asociadas a las emisiones durante la producción de petróleo y gas natural. La tendencia del incremento mundial de CH_4 se presenta en la Figura 2-1. Esta figura se construyó a partir de la información recabada a partir de los gases atrapados en el interior de pequeñas burbujas en el hielo en los diferentes polos. El CO_2 y CH_4 , dentro de esas burbujas muestran que desde la época industrial (en torno a mediados de la década de 1800) las concentraciones de CO_2 y CH_4 se han incrementado rápidamente.

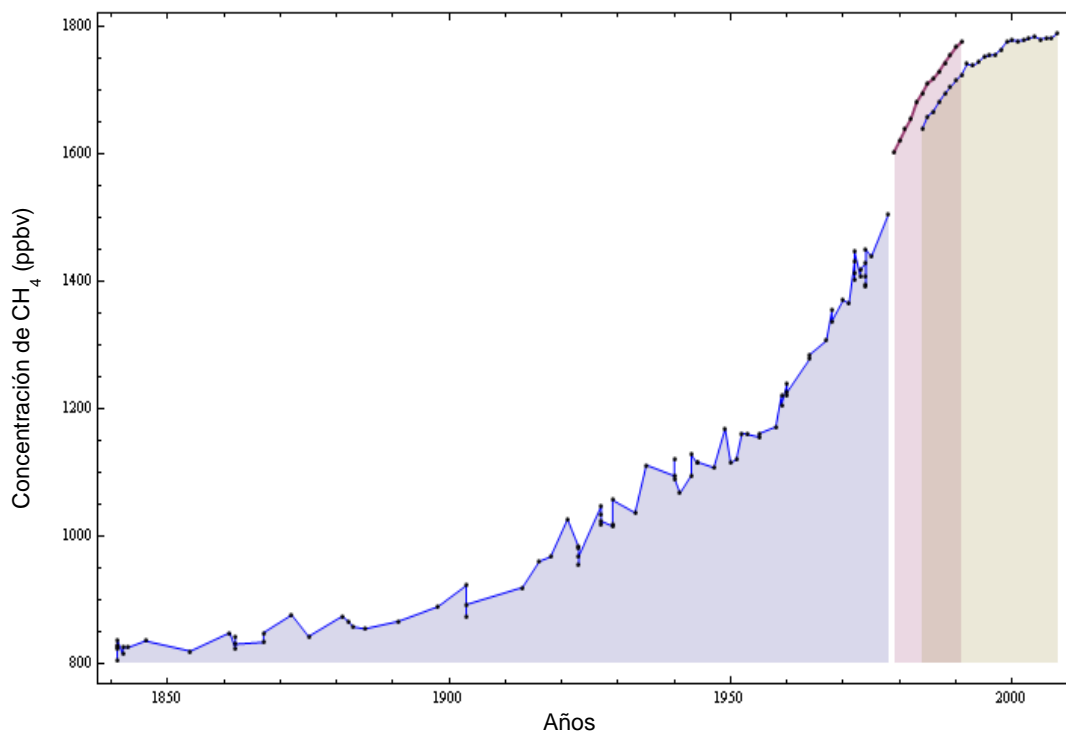


Figura 2-1. Evolución de la concentración de CH_4 en la atmósfera, deducido a partir de mediciones en burbujas de hielo (Trends in atmospheric CH_4 , 2008).

Los límites de explosividad del CH₄ están entre 5-15 % v v⁻¹ en aire (Apel et al., 1990), lo que implica que la operación de procesos en este intervalo de concentraciones tiene un riesgo latente de explosión, como es el caso de la exploración de minas y la extracción de gas natural, donde los sistemas de prevención diluyen el gas a concentraciones menores del 1% en aire, a través de estos sistemas de venteo el CH₄ se libera a la atmósfera sin tener un tratamiento.

2.1.2 Procesos donde se genera CH₄

El CH₄ es resultado de la digestión anaerobia de materia orgánica y se produce por microorganismos presentes en ambientes anóxicos con disponibilidad de compuestos orgánicos, el proceso se divide en tres etapas: 1. Hidrolización de polímeros de la materia orgánica a monómeros. 2. Acidogénesis: Las moléculas son fermentadas y producen compuestos orgánicos solubles; convirtiendo CO₂ y H₂ a formiatos, acetatos y alcoholes principalmente. 3. Metanogénesis, el acetato y otros ácidos orgánicos son entonces metabolizados a CH₄ y CO₂, por microorganismos metanogénicos, que pertenecen al dominio Archaea. La acidogénesis y generación de CH₄ son procesos sincronizados por asociaciones mutualistas de microorganismos.

Las principales fuentes donde se genera CH₄ se muestran en la Figura 2-2.

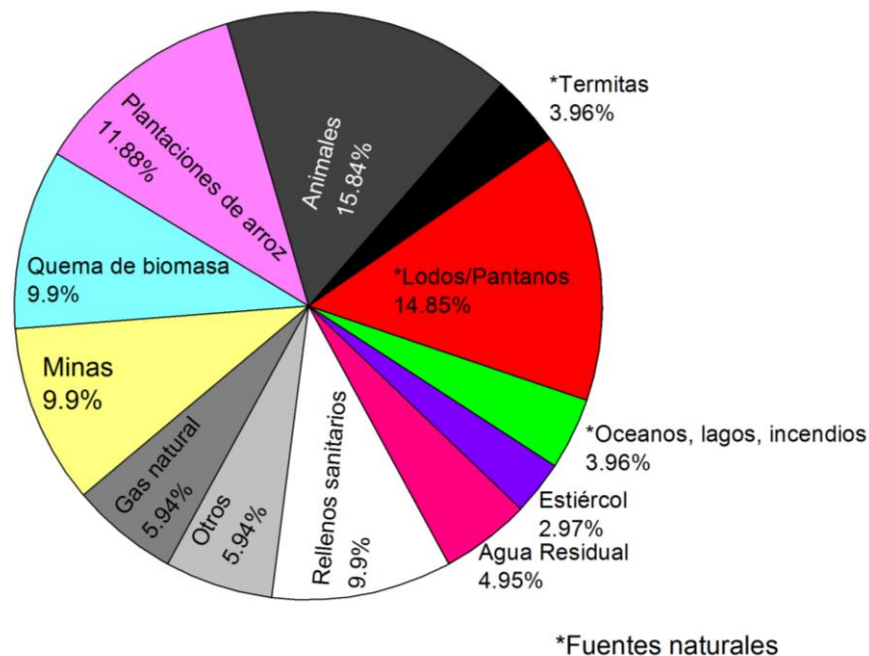


Figura 2-2. Fuentes de CH₄, origen antropogénico y fuentes naturales (IPCC, 2013).

Los principales lugares en donde se genera CH₄ se describen a continuación:

- En ambientes subterráneos durante actividades mineras de extracción de carbón (34 Tg_{CH₄} año⁻¹). El CH₄ es un peligro latente debido a que al combinarse con el oxígeno del aire, puede llegar a un nivel de explosividad (5-15 % en aire).
- Durante la extracción y refinación de petróleo, como un gas de desecho, y también en la extracción y distribución del gas natural (60 Tg_{CH₄} año⁻¹) (SEMARNAT, INE, 2006).
- Los campos de arroz son la mayor fuente de CH₄ cuyas emisiones no pueden controlarse por el hombre. Estos se encuentran inundados por extensos periodos de tiempo, propiciando condiciones anaerobias para las bacterias que producen CH₄. Algunos reportes estiman que el CH₄ emitido por los campos de arroz está entre el 10 - 20 % con 50 -100 Teragramos año⁻¹. Se ha estimado que la contribución de emisiones de CH₄ por plantaciones de arroz se incrementará ya que la producción de arroz crece entre 1.6-2.8 % cada año desde 1940 (IPCC, 2013).
- La contribución de CH₄ en actividades ganaderas por rumiantes es de 190 Teragramos año⁻¹ (IPCC, 2013).
- En los rellenos sanitarios se libera biogás, que es una mezcla de CO₂, CH₄, H₂S y H₂, principalmente, estos gases son resultado de la degradación anaerobia de desperdicios orgánicos. La contribución global de CH₄ por este origen es de 30-70 Teragramos año⁻¹. En esta fuente el porcentaje de CH₄ oscila entre 40 - 70 %, el cual puede ser utilizado para producir energía, los métodos de tratamiento que se muestran a continuación dan opciones tanto para altas concentraciones de CH₄ (métodos químicos) y para concentraciones menores al 5 % de CH₄ en aire (métodos biológicos).

2.2 Métodos de tratamiento

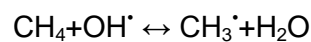
Existen diferentes maneras de contrarrestar el efecto del CH₄ en la atmósfera, algunos se dan de manera natural siguiendo el ciclo general del carbono, o existen algunos métodos desarrollados por el hombre donde se aplican procesos químicos o biológicos, la aplicación de algún método depende en gran medida de las características de la corriente contaminada, a continuación se describen los procesos naturales y algunos otros métodos desarrollados por el hombre.

2.2.1 Procesos naturales

Durante los procesos naturales se elimina CH₄ gracias a la actividad microbiana presente en la Tierra. Estos procesos son la única manera de controlar el CH₄ producido en lugares donde no es posible colectarlo y almacenarlo para su tratamiento.

ATMÓSFERA

El CH₄ se remueve de la tropósfera y estratósfera, gracias a las reacciones de oxidación iniciadas por los radicales OH[•]:



La reacción anterior promueve la formación de formaldehído, hasta convertirlo en CO₂ y H₂O, consumiendo los radicales OH[•]. El CH₄ eliminado por esta vía es de 540 Tg año⁻¹. La desventaja es que los radicales OH[•] son constantes y la cantidad de CH₄ en la atmósfera aumenta cada día (Reinoud, 1998).

AGUA Y SUELOS

Las bacterias CH₄ oxidantes conocidas como metanótrofas son aerobias y están distribuidas en el suelo y agua principalmente. Ellas son importantes reguladoras del flujo de CH₄ de la biósfera a la atmósfera (Gunnar et al., 2004). Se ha calculado que el CH₄ emitido anualmente es de 700 Tg año⁻¹, y que la reducción debida a la acción de los microorganismos es de 30 Tg año⁻¹ (Pawlowska y Stepniewski, 2006).

2.2.2 Métodos químicos y biológicos

En la Tabla 2-2 se muestran algunas tecnologías para eliminar compuestos orgánicos como el CH₄ (Revah y Morgan-Sagastume, 2005).

Tabla 2-2. Tecnologías químicas y biológicas para eliminar compuestos orgánicos presentes en efluentes gaseosos.

Tecnología	Principio	Consideraciones
Lavadores químicos	Proceso de absorción con reacción. Se usa para controlar olores oxidando los contaminantes con hipoclorito u otro oxidante químico. El oxidante se consume al reaccionar por lo que es necesario agregarlo continuamente.	Se pueden generar compuestos indeseables por la oxidación química parcial. Pueden ser torres de aspersion o empacadas.
Incineración	Los contaminantes son oxidados a CO ₂ y H ₂ O en quemadores. Se requiere generalmente una corriente de combustible suplementario. Pueden emitirse además NO _x , CO, HCl y otros COV (Compuestos orgánicos volátiles).	La combustión sólo es posible cuando la concentración de CH ₄ en el aire está dentro los límites de explosividad (Apel et al., 1990)
Membranas selectivas	El aire contaminado pasa a través de membranas selectivas en donde los COV son selectivamente absorbidos y concentrados.	Tecnología emergente, altos costos.
Oxidaciones avanzadas	Uso de oxidantes más potentes (UV, O ₃) o catalizadores que generan (TiO ₂) para oxidar a los contaminantes del aire.	Tecnología emergente de alto costo.
Sistemas biológicos	Los contaminantes son mineralizados (H ₂ O, S, SO ₄ , CH ₄ , NO _x , HCl) por medio de microorganismos que se encuentran inmovilizados o en suspensión.	Comprenden sistemas como biocubiertas, biofiltros, éstos son de gran interés por los bajos costos de operación; incluye reactores de partición de dos fases y reactores capilares (Muñoz et al., 2007; Rocha-Ríos et al., 2009).

2.3 Métodos biológicos

Entre las diferentes configuraciones de biorreactores, que se han utilizado para la eliminación de CH_4 , se encuentran: biofiltros, biofiltros de lecho escurrido, columnas de burbujeo, tanques agitados y reactores capilares (Figura 2-3). En los biorreactores cerrados, el aire contaminado se suministra por ventilación forzada, ya sea en modo de flujo ascendente o descendente a través de un sistema de bombeo, mientras que en biorreactores abiertos la emisión de CH_4 se dirige directamente al sistema de tratamiento (por ejemplo, gas de vertedero a las biocubiertas) y el O_2 difunde desde el aire en la parte superior del biorreactor, para llevar a cabo la biotransformación.

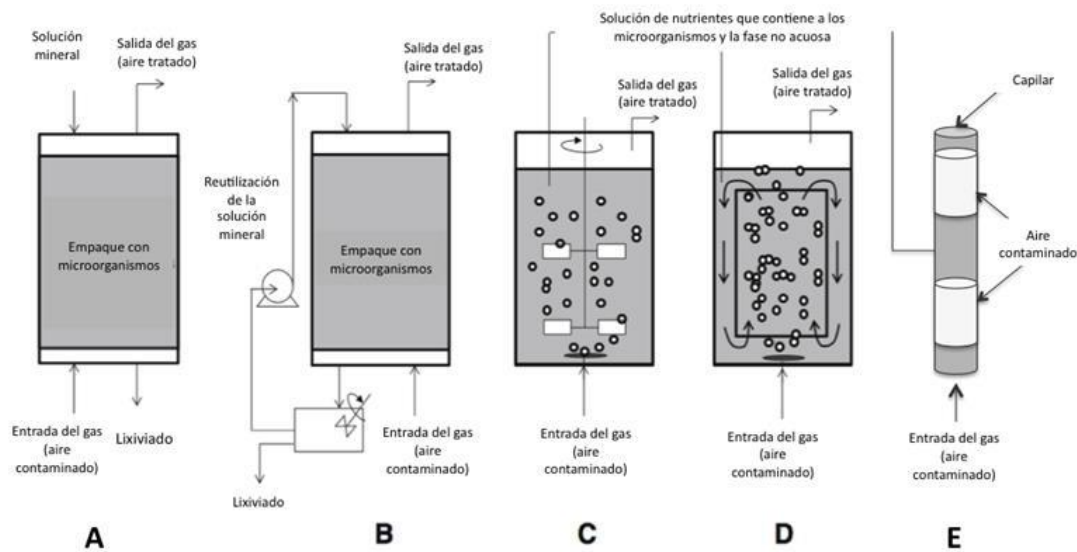


Figura 2-3. Configuraciones de biorreactores para el consumo de CH_4 : **A**, Biofiltro; **B**, Biofiltro de lecho escurrido; **C**, Tanque agitado; **D**, Airlift con tubo concéntrico y **E**, Reactor capilar (Lopez et al., 2013).

2.3.1 Biocubiertas y biofiltros

Las biocubiertas son un ejemplo de sistema abierto que consiste en capas de composta madura que contienen a los microorganismos metanotróficos. Éstas tienen varias ventajas operacionales como una área de tratamiento grande, alta retención para aumentar la eficiencia de oxidación y una larga duración cuando se tratan flujos bajos de CH_4 . La mayor ventaja es su aplicación *in situ* para el tratamiento de CH_4 procedente de la extracción del gas natural o de rellenos sanitarios. En caso de las biocubiertas la eliminación de CH_4 se reporta por unidad de área, en el caso de las biocubiertas, el rango está entre $0.3\text{-}16 \text{ g m}^{-2} \text{ h}^{-1}$.

La biofiltración es una tecnología viable para el control de la contaminación del aire proveniente de fuentes estacionarias. Algunas configuraciones de reactor para el tratamiento de efluentes gaseosos son: biofiltros, biofiltros de lecho escurrido y biolavadores, los cuales representan soluciones económicamente atractivas y efectivas, útiles para el tratamiento de contaminantes en bajas concentraciones. Estas tecnologías se basan en la habilidad natural de microorganismos para convertir contaminantes orgánicos a CO_2 , agua, compuestos inorgánicos y biomasa (Revah y Ortiz, 2004). La biofiltración ofrece una ventaja muy grande al operar a presión atmosférica normal y temperatura ambiente (Nikiema et al., 2007). Desafortunadamente, la biofiltración no es apropiada cuando existe inhibición de la actividad microbiana (ej. a altas concentraciones de COV que pueden ser tóxicas) o cuando existen limitaciones de transferencia de masa de los contaminantes y del oxígeno desde la fase gas a la fase sólida o líquida (Muñoz et al., 2007). Aunado a lo anterior, la biofiltración puede presentar problemas como canalización de flujo y dificultad para mantener las condiciones homogéneas para la fase biótica (Revah y Ortiz, 2004), además en los biofiltros de lecho escurrido puede ocurrir taponamiento por exceso de producción de biomasa cuando existe una alimentación periódica de nutrientes. Dentro de las ventajas de los biofiltros es que pueden tratar eficientemente corrientes con alto flujo y baja concentración de contaminantes en comparación con otros métodos de eliminación (Figura 2-4).

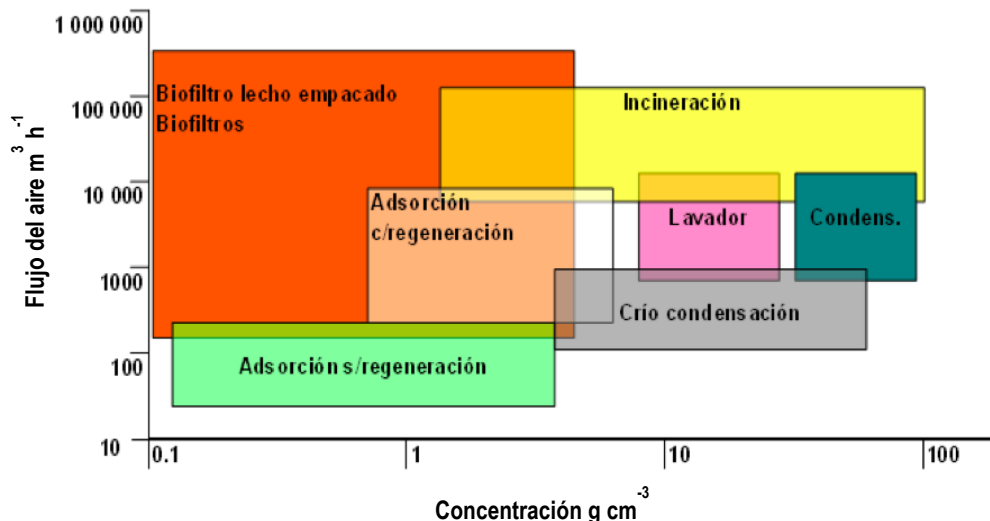


Figura 2-4. Intervalos de aplicación de métodos químicos y biológicos (Revah y Ortiz, 2004).

El proceso de biofiltración se considera satisfactorio cuando se llega a la mineralización. Si bien desde el punto de vista de eliminación de contaminantes por métodos biológicos es aceptable, la controversia surge debido a que estos procesos generan CO₂ que es el principal gas del efecto invernadero. Sin embargo debido a que parte del carbono se utiliza para generación de biomasa, las emisiones de CO₂ son menores comparadas con tecnologías como la incineración donde cada molécula de CH₄ se convierte en una de CO₂ (Nikiema et al., 2006).

En el caso de los biofiltros la capacidad de eliminación (CE) es baja (entre 20 - 29.2 g m⁻³ h⁻¹); así que se han definido estrategias para incrementar estos valores; una de ellas es agregar aceite de silicón en un biofiltro de lecho escurrido, donde la CE aumentó a 51 g m⁻³ h⁻¹ (Rocha-Ríos et al., 2009). En algunos biofiltros se ha observado que la temperatura en el lecho del biofiltro se incrementa, esto como consecuencia de la reacción de biodegradación dentro de los rellenos sanitarios o sistemas que tratan efluentes con altas cargas de contaminantes (Nikiema et al., 2006, Morales et al., 1998). En particular se ha observado que la temperatura puede influir sobre las poblaciones presentes e influenciar la composición de los lípidos en las bacterias, lo anterior se determinó en un cultivo puro de *Methylococcus capsulatus* para el caso de biofiltros metanotróficos acoplados a rellenos sanitarios, su actividad puede disminuir debido a cambios en la presión parcial del CH₄ y oxígeno, lo que significa que la población metanótrofa regularmente se encuentra privada del CH₄ y oxígeno por largos periodos (Gerbert et al., 2003; Gunnar et al., 1998).

2.3.2 Reactores de partición de dos fases líquidas

El tratamiento de COV en un bioreactor se basa en la capacidad aerobia de los microorganismos heterotróficos para usarlos como fuente de carbono y energía. Esto implica que los contaminantes y el oxígeno deben transferirse de la fase gaseosa a la fase acuosa donde pueden metabolizarse por los microorganismos.

Los reactores de partición con dos fases líquidas, TPPB (por sus siglas en inglés, Two-Phase Partitioning Bioreactor) o reactores bifásicos surgieron a finales de los 80s, con la finalidad de superar limitantes que se presentan en los sistemas de remoción de contaminantes: 1. La alta toxicidad de algunos sustratos o productos celulares que resultan en inhibición microbiana y afectan la actividad catalítica; 2. La baja solubilidad de los sustratos en la fase acuosa (Arriaga et al., 2006; Muñoz et al., 2007).

Su uso se ha propuesto para reducir el efecto de la limitación debida a la transferencia de masa, que se presenta en algunos tratamientos biológicos con gases y vapores poco solubles en agua, los TPPB pretenden extender el intervalo de aplicación

biológica en el tratamiento de aire contaminado que ha estado limitado a compuestos de solubilidad alta o media. Los reactores de dos fases contienen una fase no acuosa (ej. Hexadecano, aceite de silicón) que se agrega en una determinada proporción a una fase acuosa. La fase no acuosa mejora la transferencia de los COV hidrofóbicos y oxígeno a los microorganismos, ésta deberá ser no biodegradable, no volátil, inmisible y biocompatible con el contaminante a fin de tener buena partición. Una fase orgánica que ha demostrado cumplir con todas las propiedades es el aceite de silicón. Sin embargo, el uso de aceite de silicón tiene como inconveniente su elevado costo, por lo tanto se debe considerar que se pueda recuperar y reutilizar. Cualquier configuración de reactor puede adaptarse para crear un TPPB adicionando una fase orgánica a fin con el proceso a estudiar. Esto se ha hecho recientemente en tanques agitados y biofiltros de lecho escurrido (Rocha-Ríos et al., 2009; Rocha et al., 2010).

La Figura 2-5 muestra la distribución y transporte de sustratos hidrofóbicos como el CH_4 y O_2 en: A) Un sistema convencional (fase gas-líquido) donde la remoción de los contaminantes está limitada por la transferencia del sustrato de la fase gas hacia la fase acuosa.

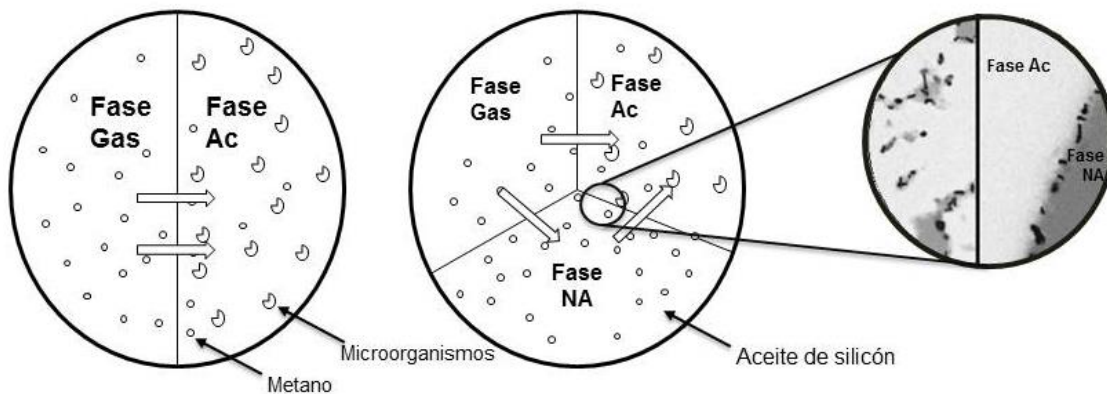


Figura 2-5. Representación de un sistema A) convencional (fase gas-Ac) y B) un reactor de partición (fase gas - Na - Ac); se muestra la interacción de los microorganismos con la fase na. Ac = acuosa, Na =no acuosa. Fotografía tomada de Carolan et al., 2005.

En este caso el coeficiente de partición del CH_4 es de 33.5 (Zenhao et al., 1992) que corresponde al valor en agua, con una solubilidad de 7 mg L^{-1} y B) Un reactor de partición de dos fases líquidas (acuosa-orgánica) donde globalmente la cantidad de sustrato en el sistema se incrementa debido a la presencia de una fase orgánica. En

este caso el CH₄ es más soluble en la fase orgánica, que en la acuosa presentando un coeficiente de partición 3.2 ± 0.2 en aceite de silicón (Rocha-Ríos et al., 2009).

En el caso del TPPB se ha probado que algunos microorganismos pueden adherirse a la fase no acuosa y consumir el sustrato directamente de ella. De acuerdo a los estudios de Carolan et al., 2005, una gran parte de las bacterias están asociadas a la fase orgánica y están localizadas cerca de la interfaz acuosa-orgánica de donde toman los elementos necesarios para su crecimiento (Figura 2-5).

Algunos estudios previos de Daugulis, 2001; Arriaga et al., 2006; Muñoz et al., 2007 han confirmado que la adición de una segunda fase orgánica puede globalmente incrementar hasta en 100 veces la solubilidad de compuestos hidrofóbicos, mejorando significativamente la eficiencia de remoción en las diferentes configuraciones de reactor utilizadas.

2.4 Microorganismos metanotróficos

2.4.1 Fisiología y taxonomía

Las bacterias encargadas de la degradación de CH₄ se conocen como metanótrofas. Ellas son generalmente gram-negativas y constituyen un sub-grupo de metilótrofos dentro de los géneros gama y alfa de las proteobacterias, ya que se especializan en la degradación de compuestos que tienen un solo átomo de carbono, lo utilizan como donador de electrones y como única fuente de carbono para la generación de energía (Madigan et al., 2003).

Los organismos metanotróficos se agrupan en tres clasificaciones dependiendo de su asimilación de carbono. Los estudios filogenéticos de 16S rRNA han confirmado la diferencia entre metanótrofos, tipo I y tipo II (Gunnar et al., 2004), los metanótrofos tipo I crecen más rápido que los tipo II cuando el nitrógeno inorgánico no es una limitante (Visscher y Cleemput, 2003), los tipo X conjugan características de tipo I y II.

Pertenecen al tipo I: *Methylomonas*, *Methylomicrobium*, *Methylocaldum*, *Methylophaga*, *Methylosarcina*, *Methylothermus*, *Methylohalobius* y *Methylosphaera*; que asimilan formaldehído por la ruta de la ribulosa monofosfato y sus membranas celulares están hechas principalmente de ácidos grasos de 14 y 16 carbonos. Estos microorganismos están clasificados como aerobios obligados.

Tipo II: *Methylocystis*, *Methylobacterium*, *Methylocella*, *Methylocapsa* y *Methylosinus*, que usan la ruta de la serina para la asimilación de formaldehído (intermediario en la degradación de CH₄), sus membranas contienen ácidos grasos de 18 carbonos organizados en la periferia de la célula; el género *Methylocella* también puede usar otros compuestos como acetato, piruvato, malato y etanol. Estas son bacterias aerobias facultativas (Asenjo y Suk, 1986).

Las bacterias del Tipo X se agrupan dentro del género *Methylococcus*, que combina propiedades de los tipos I y II, es decir, utiliza ácidos grasos de hasta 16 carbonos y la asimilación de formaldehído hacia dos rutas el ciclo de la ribulosa monofosfato y la ruta de serina (Donovan et al., 2005). La mayoría de los metanótrofos pertenecen a los microaerófilos obligados, consumiendo concentraciones de oxígeno menores a la atmosférica (Pawlowska y Stepniewski 2006), dentro de los tres tipos, existen bacterias termófilas, acidófilas, alcalófilas y halófilas. En la Tabla 2-3 se presentan algunas características morfológicas y fisiológicas de las bacterias metanotróficas. Los microorganismos metilótrofos; *Methylosinus trichosporium* OB3b, *Methylobacterium organophilum* XX y *Methylocystis parvus* OBBP se han estudiado por sus capacidades sobresalientes para degradar CH₄ o metanol y acumular polímeros biodegradables, cuando estos dos sustratos se utilizan como única fuente de carbono y energía.

Tabla 2-3. Algunas características de las bacterias metanotróficas (Madigan et al., 2003).

Organismo	Morfología	Grupo 16S rRNA	Forma de resistencia	Ruta de asimilación	Fijación del N ₂	DNA (GC mol %)
<i>Methylomonas</i>	Bacilo	γ	Quistes	Ribosas	No	50-54
<i>Methylomicrobium</i>	Bacilo	γ	Ninguno	Ribosas	No	49-60
<i>Methylobacterium</i>	Coco, cocobacilo	γ	Quistes	Serina	No	50-54
<i>Methylococcus</i>	Coco	γ y α	Quistes	Ribosas	Si	62-64
<i>Methylosinus</i>	Bacilo o vibrioide	α	Exoespora	Serina	Si	63
<i>Methylocystis</i>	Bacilo	α	Exoespora	Serina	Si	63
<i>Methylocella</i>	Bacilo	α	Exoespora	Serina	Si	61

Debido a las relaciones filogenéticas entre las eubacterias rosas-moradas, se puede establecer un acercamiento con otros géneros de microorganismos que producen

polímeros biodegradables asimilando fuentes de carbono diferentes, como *Wautersia* que utiliza glucosa o sacarosa.

2.4.2 Bioquímica: Actividad metanotrófica, metano monooxigenasa (MMO)

El CH_4 degradado puede mineralizarse a través de una serie de reacciones, donde la primera enzima y la más estudiada es la metano monooxigenasa. En la figura 2-6 se muestra la ruta de mineralización del CH_4 . En este sentido, la ruta metabólica también se complementa con la capacidad de las bacterias metanótrofas para producir polímeros exocelulares e intracelulares simultáneamente durante su ciclo natural de vida.

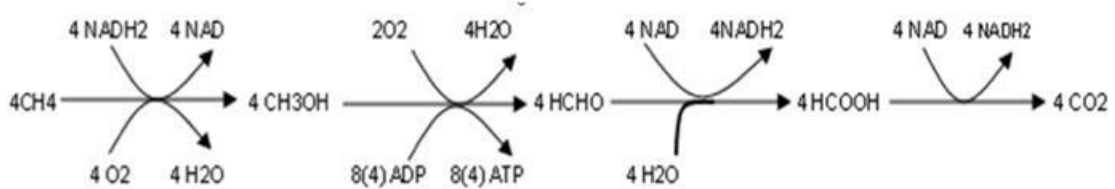


Figura 2-6. Mineralización del CH_4

Una gran parte de la capacidad metanotrófica se debe a que los microorganismos son capaces de sintetizar la enzima MMO, éste es el factor clave en la descomposición del CH_4 .

Existe en dos formas: MMO particulada (pMMO) y MMO soluble (sMMO); la pMMO está presente en todos los metanótrofos conocidos (Murrell y Radajewski, 2000). En la Figura 2-7 se esquematizan cada una de las vías de asimilación utilizando las diferentes MMO. Se sabe que los metanótrofos tipo I tienen principalmente pMMO, que crecen más rápido y son más específicas para metano que las que tienen sMMO (tipo II y X).

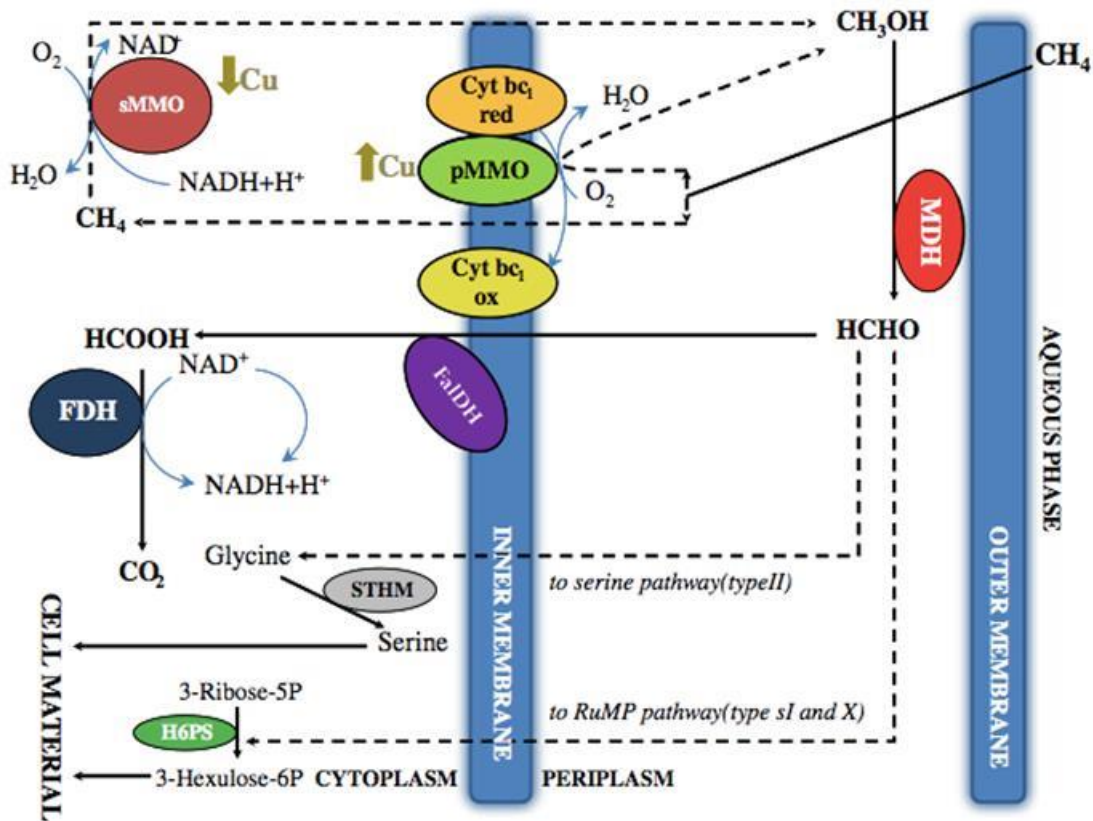


Figura 2-7. Oxidación de CH_4 en metanótrofos tipo I y II. Las líneas continuas representan un flujo unidireccional en la vía, mientras que las líneas discontinuas representan vías alternativas. MDH, metanol deshidrogenasa; formiato deshidrogenasa FDH; FALDH, formaldehído deshidrogenasa, *cyt red/ox* del citocromo reducido/oxidado; STHM, serina hidroximetiltransferasa; H6PS, hexulosa-6-fosfato sintasa (Lopez et al., 2013).

Aunque pMMO se desarrolla rápidamente es más sensible a la variación de nutrientes como cobre, nitrógeno y la concentración de CH_4 , esto puede ser un criterio para seleccionar algún tipo de bacterias en especial.

Por otro lado, la sMMO es muy estable en varios ambientes, durante la caracterización de la enzima sMMO se estableció que contiene una hidroxilasa formada de tres componentes que forman un complejo (Murrell y Radajewski, 2000). Existen diferentes estudios a nivel macro en donde se han determinado las concentraciones óptimas de los cofactores involucrados con la actividad MMO como son Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} y K^+ (Shah et al., 1996; Wendland et al., 2001; Helm et al., 2006; Zhang et al., 2008).

2.4.3 Parámetros cinéticos de la oxidación de CH₄

La oxidación de CH₄ se ha descrito a través de modelos como el de Michaelis-Menten y Monod. Sin embargo, tasas de consumo bajas derivan en bajas tasas de crecimiento haciendo que la estimación de parámetros cinéticos se dificulte.

Los valores de algunos parámetros cinéticos relacionados con la afinidad hacia el sustrato se muestran a continuación y en específico son para la sMMO. La constante de Michaelis-Menten (K_M) determina el ritmo de la actividad enzimática total y oscila entre 31.7×10^{-9} y 2.8×10^{-5} M, el valor más bajo denota la alta afinidad de algunas enzimas bacterianas para la oxidación del CH₄ (Scheutz-C et al., 2009). Del mismo modo, la constante de Monod (K_S) define la afinidad de los microorganismos para los sustratos y, en el caso particular de CH₄, oscila típicamente de 1×10^{-6} a 4.74×10^{-4} M.

Las bacterias portadoras de la pMMO tienen mayor afinidad por CH₄ que las que presentan sMMO. Las tasas de oxidación del CH₄ dependen de parámetros tales como: nivel de cobre, oxígeno disuelto, contenido de humedad, temperatura, pH, tipo de fuente de nitrógeno, o las concentraciones de CH₄.

Por lo tanto, ambos tipos I y II exhiben su tasa de oxidación máxima a concentraciones de gas que oscilan entre 1.5 y 10. 5% v v⁻¹ lo cual es congruente con la relación estequiométrica de la reacción de mineralización de CH₄ (Figura 2-7) (Wilshusen et al., 2004). También se ha encontrado que la oxidación de CH₄ es más alta en muestras de suelos ácidos a valores de pH entre 4 - 5 en comparación con los de suelos neutros con pH de 6 - 8.

2.5 Subproductos generados de la degradación de CH₄

Las bacterias metanótrofas han atraído gran interés, por sus aplicaciones potenciales para la producción de proteína celular simple y polímeros exocelulares, en la síntesis orgánica de pigmentos y en la degradación de hidrocarburos alifáticos clorados (Bilbo et al., 1992); teniendo como objetivo producir compuestos de valor agregado a partir de residuos. Las bacterias metanótrofas juegan un papel muy importante en el ciclo global del carbono (Donovan et al., 2005) y en los procesos de bioremediación tal como la degradación del CH₄ proveniente de fuentes antropogénicas.

Algunas investigaciones han mostrado que la velocidad de oxidación de CH₄ declina a partir de la formación de sustancias exopoliméricas (EPS) (Bilbo et al., 1992). La síntesis de exopolisacáridos en bacterias depende de la proporción carbono/nitrógeno alimentada en el medio de cultivo, es importante destacar que mientras las bacterias

estén en mayor estrés, producirán mayores cantidades de polímeros; un ejemplo es el caso de los metanótrofos termotolerantes productores de EPS.

Los productores de EPS que usan gas natural son: *Methylomonas rubra* 15sh, *Methylobacter ucrainicus* 159, *Methylobacter* sp. 100 y *Methylobacter luteus* 12b; en principio, estos se usaron para obtener EPS en la industria petrolera en plantas móviles usando los gases ricos en CH₄ (Malashenko et al., 2001).

Dentro de los subproductos generados a partir de CH₄ están los PHA (Polihidroxicanoatos), los cuales son polímeros biodegradables similares al polipropileno.

2.5.1 Polihidroxicanoatos (PHA)

Los PHA son biopolímeros biodegradables producidos por microorganismos y plantas. Poli(3-hidroxibutirato) (PHB) y poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (P(3HB-co-3HV)) son los mejores representantes de esta clase de polímero que tienen propiedades similares a polímeros petroquímicos como el polipropileno, y pueden producirse a partir de fuentes renovables. Estos polímeros tienen altos costos de producción que limitan su uso generalizado (Bengtsson et al., 2010). Durante la última década, las investigaciones se han centrado en el desarrollo de procesos alternativos que sean rentables para la producción de PHA, incluyendo el uso de sustratos de bajo valor (residuos o excedentes agrícolas o industriales materias primas alimenticias) (Lee et al., 2008; Zúñiga et al., 2011), cultivos microbianos mixtos (Serafim et al., 2008), cepas recombinantes (Atlic et al., 2011), y el desarrollo de estrategias eficientes de cultivo para la producción de alta densidad celular en tiempos cortos.

El uso de sustratos agroindustriales de bajo costo o gratuitos pueden disminuir los costos de producción de PHA, ya que éste representa el 30 % de los costos de producción de PHB (Choi y Lee, 1997). Algunos sustratos podrían ser la melaza de cítricos (80 g L⁻¹), suero de leche (40 g L⁻¹) o corrientes de gases contaminadas con CH₄ al 1-2 % proveniente de las fuentes de venteo en las minas o en la refinación del petróleo.

Una gran variedad de microorganismos bajo limitación de nitrógeno y fosfato pueden acumular PHA siempre y cuando la fuente de carbono no sea limitante, el PHB fue el primer miembro identificado y estudiado a detalle.

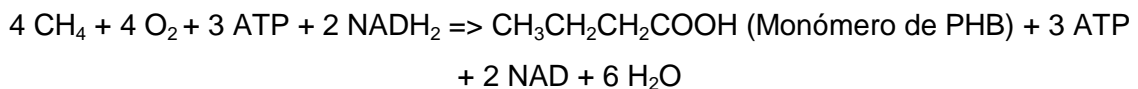
El PHB tiene alta cristalinidad (55-80 %), su temperatura de fusión es de 175 °C, es resistente a la humedad. La degradación del PHB se da en 4 semanas, mientras la

degradación de polipropileno tarda cientos de años (Lee et al., 1995). El PHB se almacena en forma de gránulos intracelulares, como reserva de energía y esto se ha observado en metanótrofos tipo I y II (Wilshusen et al., 2004).

El PHB por sus características biodegradables tiene aplicaciones biomédicas en la producción de hilos, alfiles, suturas y grapas quirúrgicas, para cubrir heridas, reemplazar huesos y láminas dentro de un cuerpo, también se utiliza para la lenta liberación de medicamentos y puede ser sustituto de tejido muerto o no funcional; otras aplicaciones son la manufactura de artículos como máquinas de afeitar, utensilios, pañales, productos para la higiene femenina, contenedores de cosméticos, shampoo, etc; también puede usarse para empacar comida y en la encapsulación de agroquímicos como insecticidas, fertilizantes y herbicidas además es un intermediario para la síntesis de varias drogas. Actualmente el precio del PHB está entre 15-30 dólares por kilo (Serafim et al., 2008).

2.5.2 Síntesis de PHA en bacterias metanotróficas y ventajas de la síntesis de copolímeros

La ecuación para la síntesis de PHB a partir de CH₄ es:



En la Figura 2-8 se muestra la ruta de degradación del CH₄ y la producción del PHB. Dicha ruta muestra que el crecimiento celular depende de la producción de energía intracelular (ATP) durante la oxidación de CH₄. Lo anterior implicaría que el carbono removido se dirigirá a la síntesis de biomasa cuando no hay limitación por nutrientes (Xing et al., 2006). El conocimiento y análisis de la ruta ha dirigido a la implementación de diferentes acciones con la finalidad de incrementar ya sea la degradación de CH₄ o la acumulación de PHB.

De esta manera, se ha reportado que el citrato tiene un efecto positivo sobre la degradación de CH₄, cuando la concentración de citrato es de 0.3 g L⁻¹, ya que puede satisfacer el ciclo de Krebs principal fuente de energía dentro de la célula, lo que mejoraría la acumulación de PHB. Bajo estas condiciones, la síntesis de biomasa se vería inhibida y los flujos de carbono serían redirigidos hacia la acumulación de PHB (Zhang et al., 2008).

Además del incremento en la productividad se ha visto la necesidad de mejorar algunas propiedades del PHB ya que existen algunas desventajas: la primera es su punto de fusión bajo y la baja elasticidad que es del 5% comparada con el polipropileno que es de 400 %. Por lo cual, el PHB es un polímero frágil, se han realizado varios intentos por superar este problema introduciendo algunos monómeros. En un estudio realizado por Días et al., 2008 se probó el efecto de la adición de propionato sobre el tipo de PHA acumulado, teniendo como resultado la acumulación de copolímeros de β -hidroxibutirato y β -hidroxivalerato (PHB-V), este experimento se realizó con un consorcio que tenía como fuente de carbono acetato, el resultado obtenido fue un polímero con menor fragilidad.

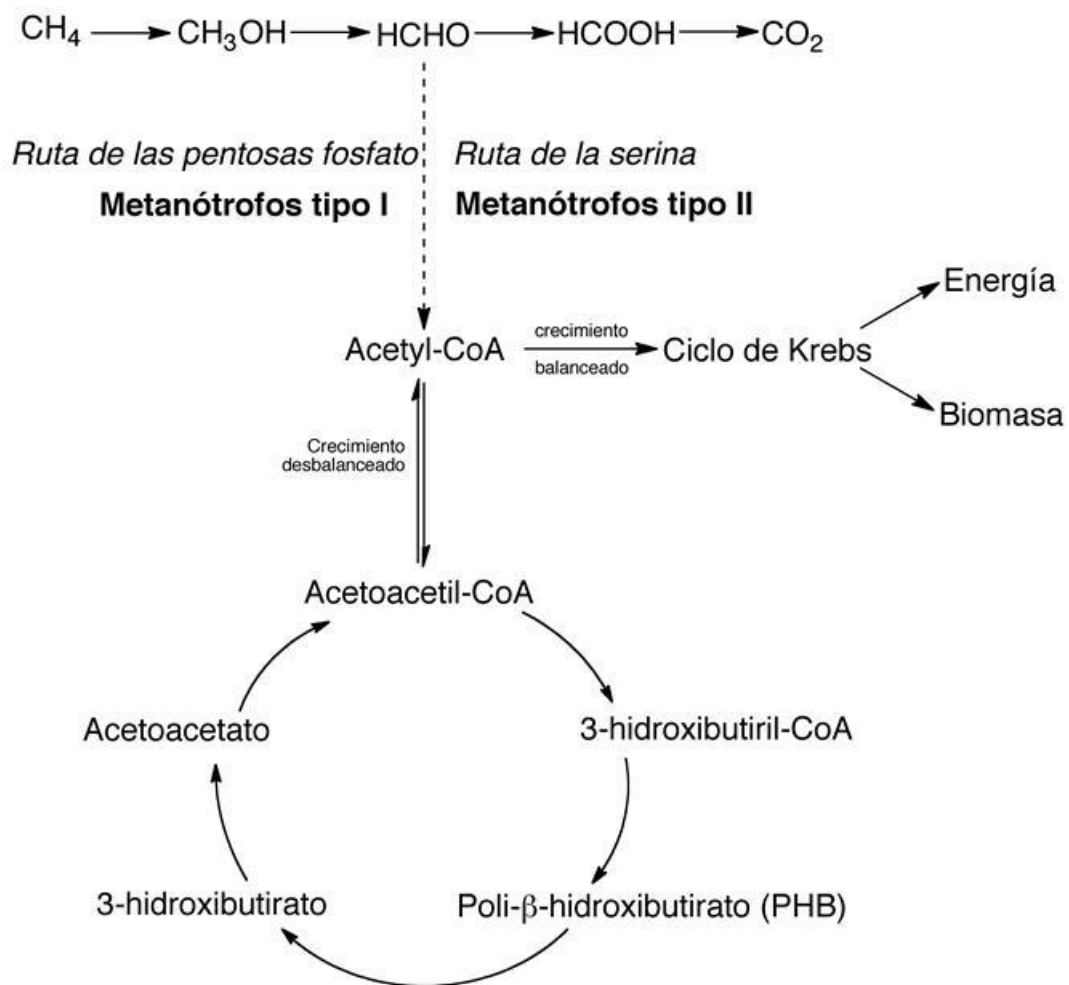


Figura 2-8. Degradación de CH_4 y acumulación de PHB en metanótrofos Tipo I y II (Zhang et al., 2008)

Dado que muchos polímeros de PHA obtenidos con microorganismos consisten en mezclas de copolímeros, conteniendo monómeros variados de diferentes tamaños, es importante entender el efecto de las mezclas sobre las propiedades del polímero. En la Tabla 2-4 se muestran las estructuras y nomenclatura de los polímeros más estudiados.

Tabla 2-4. Estructuras y PHA más comunes en la naturaleza.

$\left[\text{O}-\underset{\text{H}}{\overset{\text{R}}{\text{C}}}-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}} \right]_x$		
R=hidrógeno	3-hidroxipropionato	(3HP)
R=metil	3-hidroxibutirato	(3HB)
R=etil	3-hidroxivalerato	(3HV)
R=propil	3-hidroxicaprolato	(3HC)
R=butil	3-hidroxihexanoato	(3HH)
R=pentil	3-hidroxioctanoato	(3HO)
R=hexil	3-hidroxinonanoato	(3HN)
R=Heptil	3-hidroxidecanoato	(3HD)
R=octil	3-hidroxoundecanoato	(3HUD)
R=nonil	3-hidroxidodecanoato	(3HDD)
$\left[\text{O}-\left(\text{CH}_2\right)_n-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}} \right]_x$		
n=3	4-hidroxibutirato	(4HB)
n=4	4-hidroxivalerato	(5HV)

Los PHA con 3-5 átomos de carbono son considerados como los PHA de longitud de cadena corta (scl-PHA). Ejemplos de esta clase incluyen 3HB y 3HV. PHA de longitud de cadena media (mcl-PHA) contienen 6-14 átomos de carbono.

Mientras que los PHA con 4 carbonos fueron los primeros en producirse a nivel industrial y son los mejor caracterizados, otros copolímeros de PHA recientemente reportados son superiores en versatilidad y aplicaciones. Normalmente el P3HB tiene alto peso molecular y cristalinidad con el punto de fusión de 180 °C y un alargamiento a la rotura de 5% (Gandini y Belgacem, 2008). Se han utilizado copolímeros

específicamente diseñados para eliminar o reducir la fragilidad y la inestabilidad térmica de polihidroxibutirato. Sin embargo, los PHA de longitud de cadena media y sus copolímeros tienen baja cristalinidad (20 - 40 %) y no se rompen fácilmente (extensión a la rotura de 300 – 450 %). Se comportan como elastómeros y su composición se puede manipular para una gama de aplicaciones.

Las principales técnicas para determinar la estructura, la cantidad de los polímeros son la espectrometría de masas, protón y espectroscopía RMN ¹³C (Resonancia Magnética Nuclear), GC (Cromatografía de gases), HPLC (Cromatografía Líquida de alta resolución), GPC (Cromatografía de Permeabilidad en gel) y FTIR (IR mediante Transformada de Fourier). Los procesos de análisis mecánicos y térmicos de polímeros, tales como TGA (Análisis Termogravimétrico), DSC (Calorimetría de Barrido Diferencial) y DMA (Análisis Mecánico Dinámico).

2.6 Biología de sistemas e Ingeniería metabólica (IM)

Los antepasados de la biología de sistemas incluyen el estudio de la cinética de enzimas desde 1900 (Michaelis et al., 2011) y la aplicación de la teoría de control de sistemas biológicos en los años 1960 y 1970 (Heinrich et al., 1977). En 1960, Denis Noble desarrolló el primer modelo matemático del corazón en funcionamiento, se considera que es uno de los pioneros en el campo. Sin embargo, no fue sino hasta la década de 1990, cuando se realizaron los primeros proyectos del genoma, de donde resultaron grandes cantidades de información de alta calidad; al mismo tiempo el desarrollo computacional aumentaba y fue así como el campo realmente despegó (Tomita et al., 1997). El objetivo de la biología de sistemas está basado en el análisis de datos en lugar de la formulación de hipótesis intuitivas o aleatorias. Además, la biología de sistemas se acompaña de todas las herramientas desarrolladas para la ingeniería metabólica, la cual se centra en analizar y modificar las rutas metabólicas con el fin de lograr algún objetivo, el cual es normalmente maximizar la producción de compuestos de interés. Los intentos de cambiar el metabolismo de los microorganismos para adaptarse a los propósitos de la industria biotecnológica se han explotado durante mucho tiempo, por ejemplo para la producción de aminoácidos y antibióticos. Los primeros intentos fueron a través del uso de la mutagénesis química que es un proceso aleatorio para acelerar la evolución, además de técnicas de selección orientadas a dirigir la evolución en la dirección deseada (Stephanopoulos et al., 1998). Tales enfoques pueden ser muy exitosos, como se muestra en el caso de la producción de la penicilina, en donde el rendimiento se pudo aumentar de 3-6 μ M de

la cepa original identificada por Fleming en 1928 a más de 75 mM en 1977 (Nielsen, 1995). Sin embargo, el inconveniente de esas técnicas es que las razones metabólicas del cambio en el fenotipo, se mantenían desconocidas, lo cual hacía difícil identificar las limitaciones en las vías. A finales de la década de 1980 y principios de 1990, estuvieron disponibles las herramientas de biología molecular para realizar modificaciones genéticas, permitiendo cambios específicos en las vías metabólicas, esto se conoció en un principio como la ingeniería metabólica (Bailey, 1991).

Diferentes bioprocesos se han desarrollado, desde entonces dando una enorme variedad de productos comerciales como etanol, antibióticos, proteínas terapéuticas o vacunas. La ingeniería metabólica tiene como objetivo el diseño racional de células con capacidades de biotransformación específicas. La introducción de modificaciones genéticas específicas a rutas metabólicas con el propósito de mejorar las propiedades celulares es cada vez más importante para los procesos biotecnológicos y la medicina dando un nuevo enfoque en el diseño de sistemas biológicos. El desafío de este esfuerzo interdisciplinario radica en la necesidad de un riguroso entendimiento de las interacciones entre el metabolismo y los puntos de regulación críticos en las reacciones metabólicas *in vivo*. Algunas áreas de investigación de la ingeniería metabólica son (Stephanopoulos et al., 1998):

- 1) Herramientas experimentales y computacionales
- 2) Producción de farmacéuticos
- 3) Manufactura de combustibles y químicos
- 4) Biomateriales
- 5) Modificación de células microbianas de plantas y animales
- 6) Producción de proteínas a gran escala
- 7) Estrategias para el mejoramiento de especies
- 8) Aplicación para la regulación génica a través de terapia génica y medicina, desarrollando células para reparar el daño de órganos y tejidos
- 9) Aplicaciones ambientales
- 10) Nanotecnología

Tabla 2-5. Ejemplos de IM con aplicación en bioremediación, síntesis de PHA y metabolismo de metilótrofos.

Químico	Organismo hospedero	Orígenes o tipo de genes para bioremediación	Referencia
Degradación de CO ₂ y H ₂	<i>Actinobacillus succinogenes</i>	Estudio de la fisiología del microorganismo, para redirigir el flujo de carbono a la síntesis de succinato, disminuyendo la generación de formiato, acetato y etanol	McKinlay y Vieille, 2008
n-Butanol	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Una ruta biosintética de n-butanol fue introducida. Isoenzimas de diferentes organismos (<i>S. cerevisiae</i> , <i>E. coli</i> , <i>C. beijerinckii</i> y <i>Ralstonia eutropha</i>) fueron substituidos por enzimas de <i>Clostridium</i> . La producción de n-butanol se mejoró 10 veces a 2.5 mg L ⁻¹ .	Steen et al., 2008
Isobutaraldehído	<i>Synechococcus elongatus</i>	Una ruta metabólica no nativa fue construida para producir el cuarto carbonaldehído isobutiraldehído. Deteniendo la etapa de acumulación de aldehído mitigando la toxicidad a recuperarlo en la fase gas.	Atsumi et al., 2009
Ácidos grasos	<i>Escherichia coli</i>	Ingeniería para producir estructuralmente ésteres grasos, alcoholes grasos y ceras directamente de azúcares simples en especies defectuosas para degradar ácidos grasos. La síntesis de ácidos grasos fue desregulada con una	Lu et al., 2008; Steen et al., 2010

		tiosterasa de plantas.	
PHA	Consorcio	Estudio y desarrollo de un modelo metabólico que describe el consumo de ácidos grasos volátiles para la síntesis de copolímeros de PHB-V	Pardelha et al., 2012
PHA	<i>E. coli</i>	Análisis de control metabólico y análisis de flujos metabólicos donde se hace una descripción detallada de cómo se disminuye el flujo hacia el ciclo de Krebs cuando hay producción de PHA	Wegen et al., 2000
Metanol	<i>Methylobacterium extorquens</i>	Reconstrucción de la ruta metabólica sobre sustratos C3 y C4, aplicación de un modelo estequiométrico.	Van Dien y Lidstrom, 2002
Methanol	<i>Pichia pastoris</i>	Reconstrucción y análisis <i>in silico</i> del metabolismo de metanol, mediante la vía de las pentosas fosfato.	Bevan et al., 2010
Formaldehído	<i>Methylobacterium extorquens</i>	Análisis de flujos metabólicos de la mineralización de formaldehído mediante 2 vías diferentes.	Marx et al., 2005

En la Tabla 2-5 se muestran las aplicaciones recientes de IM en diferentes áreas como bioremediación, polímeros, combustibles, en donde se presentan diferentes aplicaciones de la síntesis de polímeros, pequeñas partes del metabolismo de los microorganismos metilótrofos y la degradación de compuestos orgánicos volátiles o recalcitrantes.

Ninguno de los ejemplos de aplicaciones de éxito de la IM conjuntan la degradación de CH_4 un sustrato en fase gas de alto impacto ambiental con la síntesis de un producto de valor agregado; aunado a esto los microorganismos metanotróficos han tomado gran interés hoy en día, debido a su importancia en el ciclo global del carbono y a que el metabolismo metanotrófico ha sido poco estudiado, ya que tiene muchas reacciones anabólicas, lo cual tiene alto potencial para sintetizar todos los componentes de la biomasa a partir de CH_4 , en un medio de sales minerales. Por eso en este trabajo se propone utilizar las principales herramientas de la IM para seleccionar un cosustrato que por un lado, contribuya al crecimiento de biomasa así como al aumento de la producción de PHA sin interferir con la degradación de CH_4 . A continuación se presenta una introducción de las bases teóricas usadas para reconstruir un modelo metabólico a escala del genoma y la teoría de análisis de flujos utilizada para su solución. En la metodología se abordará con mayor detalle los pasos seguidos durante la reconstrucción del modelo.

2.6. 1 Modelos estequiométricos

Normalmente, la formulación de un modelo estequiométrico requiere de información bioquímica detallada, junto con una amplia revisión de las diferentes bases de datos de metabolismo celular como Metacyc, Brenda, KEGG, SwissProt, etc. (Figura 2-9). Sin embargo, en el caso de rutas metabólicas poco estudiadas, la información puede ser escasa para algunos microorganismos.

El enfoque tradicional del modelado metabólico es describir los componentes del metabolismo con tal detalle que el modelo represente correctamente el fenotipo; así que mientras más detalladas sean las restricciones impuestas en un modelo, el espacio de la solución describirá sólo los fenotipos relevantes que sean factibles. El término modelado basado en restricciones (MBR) es, por lo menos cuando se aplica a modelos metabólicos, en gran parte sinónimo de análisis de flujo metabólico (AFM). Hay excelentes revisiones que describen las suposiciones y la formulación matemática

detrás de AFM (Varma y Palsson, 1994b; Edwards et al, 2001; Price et al, 2004). La siguiente figura muestra un panorama general de los pasos que se deben seguir para poder generar un modelo metabólico.

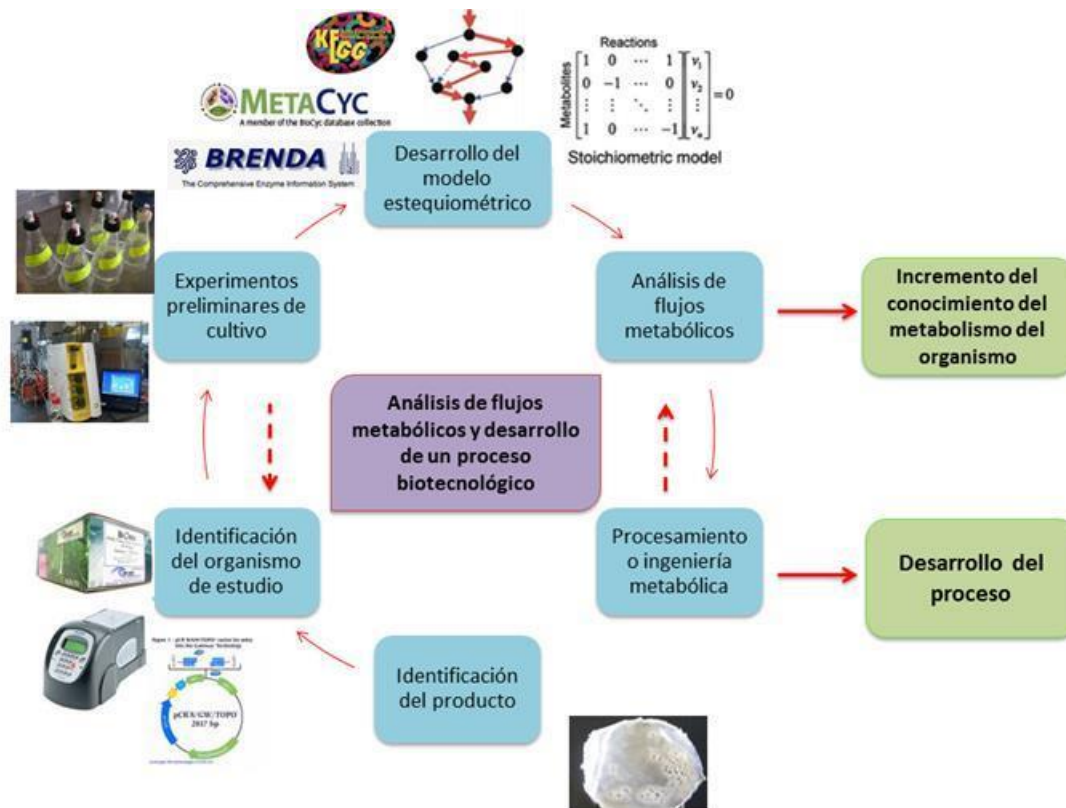


Figura 2-9. Ciclo para la describir un sistema biológico, usando IM

2.6.1.1 Aplicaciones de los modelos metabólicos a escala genoma (GEMM)

En el Anexo 1, se presenta un modelo metabólico con 10 reacciones para mostrar los principios detrás de AFM. Sin embargo, los modelos utilizados en la práctica contienen cientos o miles de reacciones y metabolitos. A partir de la secuenciación del genoma en la década de 1990, ha sido posible identificar cada enzima que existe en un organismo, y de ese modo inferir una red metabólica que describe las capacidades metabólicas de los organismos (Schilling et al., 1999). Por tanto, estos modelos han llegado a ser conocidos como modelos metabólicos a escala genoma (GEMM). Se han publicado más de 100 algoritmos para el modelado basado en restricciones utilizando GEMM, como se describe en detalle en la revisión de Lewis et al. (2012). Los métodos de optimización más utilizados son los siguientes: 1) la programación lineal (LP), 2)

programación cuadrática (QP), 3) programación lineal entera mixta (MILP), 4) la programación de dos niveles (BLP), y 5) los métodos heurísticos.

El proceso de reconstrucción de los GEMM se realiza a mano y requieren de mucho tiempo, que abarca desde varios meses para una bacteria bien estudiada a varios años para un modelo humano (Duarte et al., 2007). Este trabajo tan detallado hace que los GEMM sean poderosos, pero su alcance y estructura de varios niveles hace que el proceso de reconstrucción sea muy complejo. Esta sección ofrece una visión general del enfoque tradicional, donde los modelos se reconstruyen a mano usando datos y bibliotecas genómicas. No ha habido muchas descripciones publicadas del proceso de reconstrucción, pero el realizado por Thiele y Palsson (2010) ha tenido un impacto particularmente grande en el campo. En esa revisión en *Nature Protocols*, se recogen las prácticas de reconstrucción existentes y las resumen en un procedimiento operativo estándar 96 pasos (SOP). La Figura 2-11 representa los pasos más importantes del proceso de reconstrucción.

El nivel de detalle necesario para la reconstrucción de un GEMM, es la estequiometría de las reacciones y direccionalidades además de las enzimas asociadas a la catálisis de cada reacción. Esto puede ser contrastado con el gran número de parámetros cinéticos necesarios para la reconstrucción de los modelos dinámicos. La reconstrucción comienza con la recuperación y la organización de los datos de entrada necesarios. Según el organismo, la disponibilidad y la cantidad de información suele ser diferente. Puede decirse que la entrada mínima requerida es un genoma secuenciado y cierta cantidad de datos fisiológicos conocidos, tales como las condiciones de crecimiento. En general, cuanto mejor sea la disponibilidad de los datos fisiológicos, bioquímicos y de genética, mejor será la capacidad de predicción del modelo. La información que puede ser muy valiosa si está disponibles incluyen: datos de flujos de ^{13}C , localizaciones subcelulares medidas o bibliotecas knockout de genes. El siguiente paso es la generación de un proyecto modelo.

Esto comienza pasando a través de cada uno de los genes anotados y decidir si su función está dentro del alcance de la reconstrucción. Normalmente, sólo se incluyen las enzimas metabólicas. También hay zonas grises, tales como la metilación del ADN, la fosforilación de proteínas o el metabolismo de glicanos complejos, que a menudo están excluidos del GEMM, a pesar de que pueden ser vistos como funciones metabólicas. Las enzimas son entonces asignadas a sus respectivas reacciones metabólicas. Este paso se realiza a menudo a través del número de las enzimas asignados según la comisión de enzimas (EC) seguido de la recuperación de bases de

datos de reacciones de reacción tales como KEGG (Ogata et al., 1999). Es importante considerar que los números de la EC se refieren al tipo de transformación química en una reacción, no la clase de la enzima que lleva a cabo la conversión. Por ejemplo, tanto la etanol deshidrogenasa y colina-deshidrogenasa tienen número EC 1.1.1.1, ya que ambos actúan sobre alcoholes primarios y el uso de NAD^+ como cofactor. Por tanto, esta asignación no es exacta, y debe verse como un primer proyecto.

Problemas potenciales que se pueden presentar son: nombramiento claro de metabolitos, metabolitos genéricos como un alcohol o ácidos grasos, conversiones espontáneas, direccionalidad errónea en reacciones o estequiometrías genéricas como $\text{PHB}(n) + \text{H}_2\text{O} \Rightarrow \text{PHB}(n-1) + \text{hidroxibutanoato}$. Evaluación manual cuidadosa y la modificación de las reacciones se utiliza para borrar la lista de reacción. Las reacciones se asignan a los compartimentos subcelulares pertinentes, y las reacciones de transporte se añaden basadas en la información de literatura y la evidencia genómica. Por último, la composición química de la biomasa se determina según las mediciones experimentales o con datos provenientes de la literatura (Figura 2-10).

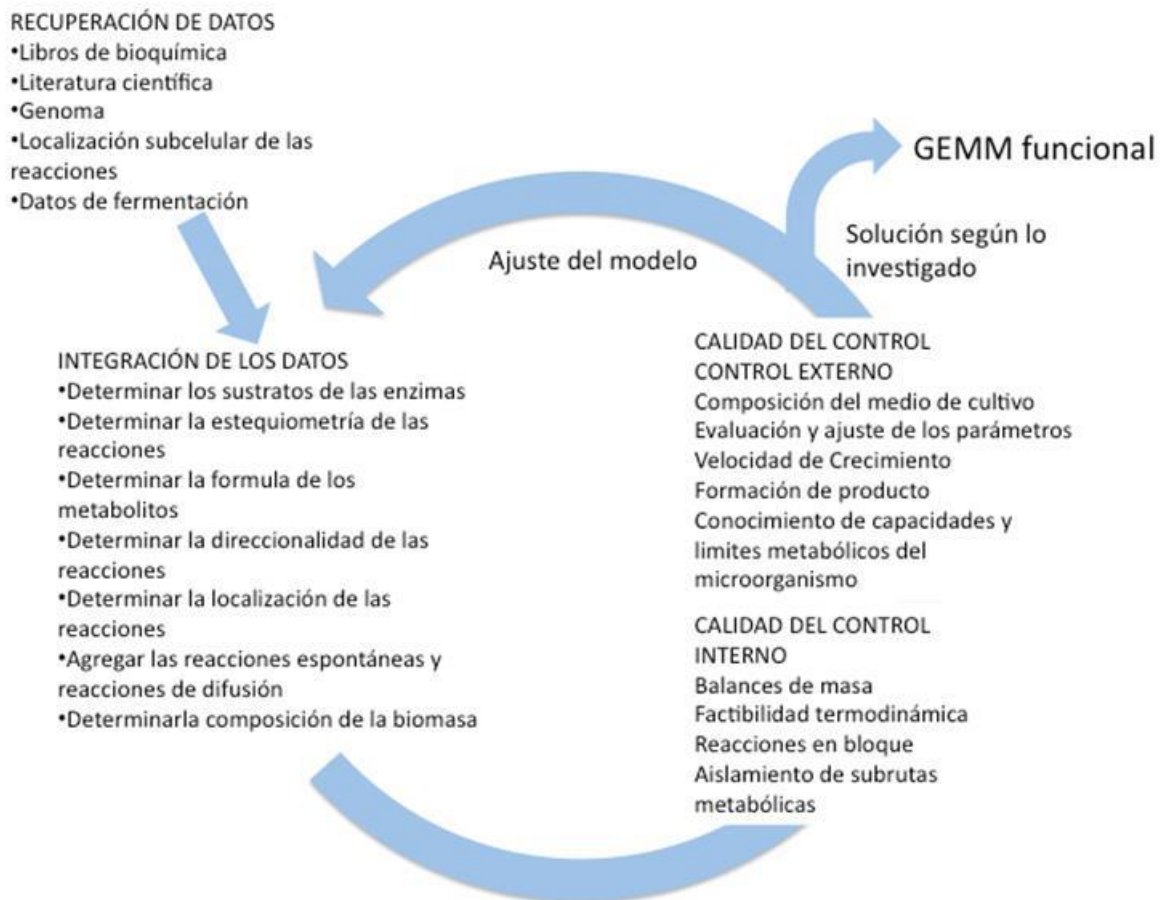


Figura 2-10. Reconstrucción de GEMM

2.6.1.2 Solución de los GEMM a través del Análisis de Flujos Metabólicos

(AFM)

Los modelos matemáticos se han utilizado para estudiar el metabolismo durante al menos 100 años, desde que Michaelis y Menten presentaron su famosa ecuación para la cinética de la enzima en 1913. Después se estimaron los parámetros cinéticos para un número suficientemente grande de las enzimas, que permitió formular pequeños modelos que podrían describir las funciones metabólicas básicas de una célula viva (Othmer, 1976). En este marco los modelos eran aplicables principalmente a las redes pequeñas, y la disponibilidad de los parámetros cinéticos era una limitante. Cuando los flujos metabólicos en estado estacionario dentro de la célula fueron de interés (en lugar del cambio dinámico en las piscinas de metabolitos), entonces éstos podrían estimarse en un método llamado análisis de flujos metabólicos (AFM) (Aiba y Matsuoka, 1979). El método se basa en la medición de las tasas de producción o consumo de metabolitos (llamado flujos de cambio) en el medio de crecimiento. Si se conoce el conjunto de las posibles reacciones enzimáticas, los flujos internos pueden ajustarse a partir de los flujos externos por regresión lineal, en el anexo 1, se muestra un ejemplo con una ruta hipotética. En este sentido diferentes procedimientos matemáticos de álgebra lineal desarrollados para la optimización de procesos en economía se han adaptado a aplicaciones biológicas que permiten la conocer el control de cada enzima en una vía, cuantificando los flujos a través de ésta, para calcular los rendimientos teóricos de producción de metabolitos en la red metabólica.

Sin embargo, esto requiere que se midan los flujos de intercambio suficientes como para que el sistema de ecuaciones resultante determinado o tenga una solución; aunado a esto se une el tema de como determinar los flujos en las partes del metabolismo donde hay reacciones cíclicas o paralelas, este reto fue superado mediante el uso de sustratos marcados isotópicamente siendo posible realizar un seguimiento de cada átomo, en lugar de cada metabolito, a través de la red metabólica.

Esto permitió una mejor resolución y modelos más comprensibles, pero las restricciones (*constrains*) fundamentales del método se mantuvieron (Wiechert, 2001). En un artículo de revisión titulado "Análisis del flujo de las redes metabólicas indeterminadas: la búsqueda de las limitaciones que faltan" Bonarius et al. (1997) describen cómo se incorporaron limitaciones adicionales, tales como el equilibrio de cofactores o la reversibilidad de las reacciones, con el fin de reducir los grados de libertad para tener un modelo determinado. Hoy en día en los modelos metabólicos a escala del genoma se incorporan limitaciones adicionales, tales como el equilibrio de

cofactores y la reversibilidad de las reacciones, con el fin de reducir los grados de libertad y tener un modelo determinado. Otro gran avance se dio cuando en los modelos se calculó un óptimo con respecto a un objetivo celular (Fell y Small, 1986), esto formó la base para el modelado basado en restricciones (MBR) del metabolismo. La determinación de la función objetivo depende de los alcances del modelo metabólico, la función objetivo más utilizada es la reacción de síntesis de biomasa.

La metodología general en la IM, es la aplicación de modelos matemáticos con el fin de identificar las limitaciones que podría estar restringiendo la producción del compuesto de interés. Tales restricciones pueden referirse a, por ejemplo, la especificidad de sustrato de las enzimas, la inhibición del producto, composición del medio, o balances redox. Una vez identificada la restricción, la ingeniería genética se utiliza para modificar la composición genética del organismo con el fin de relajar las restricciones, lo que lleva a un aumento de la producción del compuesto de interés. Las posibles estrategias incluyen la expresión de enzimas heterólogas, la sobreexpresión de enzimas endógenas, delección de genes o la modulación de la actividad enzimática, la desregulación transcripcional o enzimática, y la optimización de la composición del medio (Stephanopoulos et al., 1998). El modificar a las células de manera específica, y ver los resultados reflejados en el control de la síntesis de metabolitos, o en cambios de algunas velocidades de reacción dentro una ruta metabólica; se le conoce como Análisis de Control Metabólico (ACM). Algo muy importante para lograr el ACM, consiste en detallar y evaluar la fisiología de las células, esto comienza a partir de la evaluación macroscópica del consumo de metabolitos y las velocidades de producción, seguido de la enumeración y cuantificación de los flujos metabólicos intracelulares, donde los flujos son una propiedad muy importante de la ruta metabólica, los cuales se calculan a partir del AFM.

El AFM puede considerarse como un campo de importancia fundamental y práctica, que puede proporcionar contribuciones básicas, en la medición y entendimiento del control de flujos *in vivo*, que lleva a cabo la célula (Stephanopoulos et al., 1998; Nielsen, 2001). Esto es particularmente útil en conexión con estudios de producción de metabolitos, donde el objetivo es dirigir tanto carbono como sea posible desde un sustrato hacia un producto metabólico. Para realizar el AFM se debe plantear un modelo estequiométrico, que en conjunto con los flujos extracelulares e intracelulares medidos experimentalmente y con los flujos calculados por el modelo, permiten resolver el sistema. El grado de concordancia entre los flujos medidos y las predicciones del modelo, pueden servir para validarlo.

3.0 JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

3.1 Justificación

Una alternativa para abatir los problemas causados por el efecto invernadero es reducir la cantidad de gases emitidos a la atmósfera como el CH₄. El CH₄ es el segundo gas que más contribuye al efecto invernadero y es generado en diversos procesos industriales como la extracción y refinación de petróleo, durante la extracción de gas natural, en rellenos sanitarios, plantaciones de arroz, por rumiantes y campos inundados o pantanos principalmente.

Hay bacterias metanótrofas que mineralizan el CH₄ y también existen bacterias capaces de sintetizar compuestos de interés industrial como el PHB, teniendo al CH₄ como única fuente de carbono. El proceso estudiado en esta tesis pretende disminuir las emisiones de gases de efecto invernadero ya que una parte del carbono del CH₄ será destinado a la producción de biomasa y PHA en lugar de ser mineralizado.

En el laboratorio de emisiones gaseosas de la Universidad Autónoma Metropolitana, unidades Iztapalapa-Cuajimalpa, se adaptó y estudió un consorcio capaz de degradar CH₄, el cual fue ensayado en dos configuraciones de reactor, biofiltro de lecho escurrido y tanque agitado. Sin embargo, no se abordó el estudio de las poblaciones microbianas presentes en el consorcio y su capacidad para degradar individualmente al CH₄ ya que es posible que algunos de los microorganismos tengan mayor eficiencia estando aislados que dentro de un consorcio. La mejora se puede ver reflejada tanto en sus tasas de consumo como en su capacidad de acumular PHA.

Profundizando en estos aspectos el estudio propuesto en este trabajo de tesis contribuirá al mejoramiento del tratamiento del CH₄ y a la síntesis de compuestos de alto valor agregado. Lo anterior considerando que se producirá a partir de una fuente de carbono gratuita y de alto impacto ambiental. Es por ello que en este trabajo se determinarán qué cepas metanotróficas dentro del consorcio, previamente obtenido, tienen mejores resultados en cuanto a la degradación de CH₄ y acumulación de PHA. Para ello se utilizarán reactores de partición de dos fases (TPPB) que son una alternativa innovadora para el tratamiento de efluentes gaseosos poco solubles, tratando de superar la desventaja operacional de trabajar con CH₄ como única fuente de carbono, ya que es muy complicado alcanzar altas concentraciones de biomasa, lo cual es deseable ya que eventualmente se convertirá en PHA, así que en este trabajo también se propone utilizar técnicas recientes de ingeniería de sistemas para ampliar

el conocimiento del metabolismo metanotrófico así como para elegir algún cosustrato que mejore el proceso de biotransformación de CH₄ en PHA de alta calidad, está a través de la reconstrucción de un GEMM.

3.2 Objetivos

3.2.1 Objetivo general

Estudiar la degradación de metano y la acumulación de PHA con la cepa *Methylobacterium organophilum* CZ-2, explorando diferentes alternativas para mejorar la producción de PHA.

3.2.2 Objetivos particulares

- Estudiar la degradación de metano en reactores de partición de dos fases líquidas con la cepa aislada.
- Mejorar la producción de PHA de la cepa por medio de la modificación de las condiciones de cultivo al adicionar citrato.
- Mejorar la calidad del polímero producido al adicionar un cosustrato que favorezca la síntesis de copolímeros como PHB y PHV.
- Realizar y validar un modelo metabólico a escala genoma del proceso de producción de polihidroxicanoatos bajo condiciones metanotróficas y seleccionar cosustratos que sean viables metabólicamente.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

A continuación se muestra la metodología seguida durante toda la investigación (Figura 4-1), en las dos primeras etapas se presenta el trabajo experimental realizado y en la tercera y última parte se expone la teoría utilizada para generar un modelo metabólico a escala del genoma. En la primera etapa del proyecto se aisló una cepa metanotrófica, la cual se estudió en diferentes tipos de reactores (STR y TPPB), seguido de la caracterización de la producción de PHA. Posteriormente se estudió el efecto de la adición de diferentes cosustratos los cuales fueron seleccionados a través de un estudio metabólico donde se diseñó, implementó y validó un GEMM, el modelo fue desarrollado con el objetivo de seleccionar algunos cosustratos que incrementen la acumulación de PHA y mejoren las propiedades del polímero.

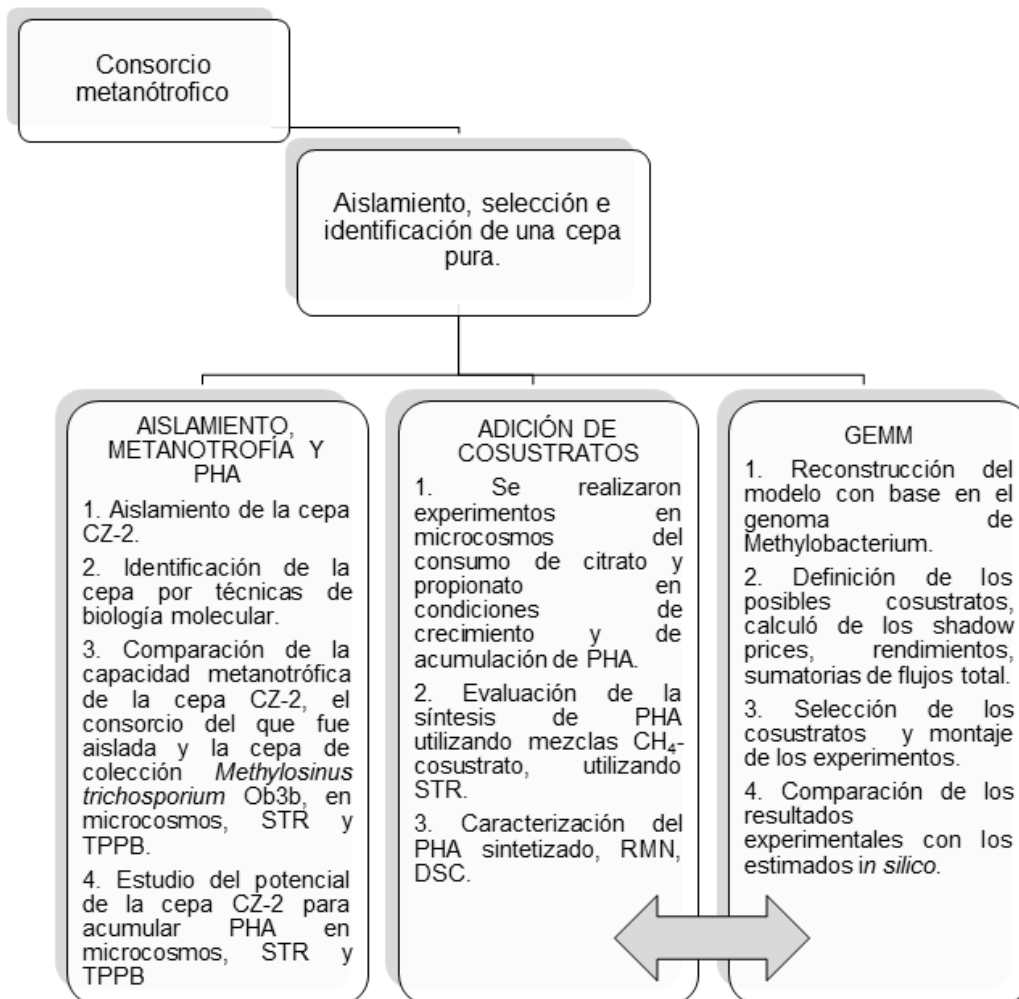


Figura 3-1. Esquema general de la metodología.

4.1 Aislamiento e identificación de las de cepas metanotróficas

4.1.1 Microorganismos y medios de cultivo

Durante el desarrollo de este proyecto se utilizó un consorcio metanotrófico, obtenido de una planta de tratamiento de aguas residuales y reportado por Rocha-Rios et al. 2009. Las bacterias se aislaron del consorcio metanotrófico por el método de estriado en placa en pases consecutivos utilizando medio de sales minerales (MSM) (Aaronson, 1970) solidificado con Gelrite Gellan Gum en una atmósfera de CH₄ al 5 % (v v⁻¹) y 30 °C; agar bacteriológico y medio Luria-Bertani se utilizaron para pruebas de pureza. El medio Winogradsky (WM) se utilizó en los estudios de limitación por nitrógeno (Wang y Bakken 1998). Los organismos que presentaron las tasas más altas de degradación de CH₄ y de acumulación de PHB se seleccionaron para estudios posteriores.

La cepa *Methylosinus trichosporium* OB3b (ATCC 49242) de la American Type Culture Collection (Rockville, MD) se usó como control y se cultivó utilizando el mineral medio de sales de amonio descrito por la ATCC (medio ATCC 1683).

4.1.2 Secuenciación del 16S rDNA y análisis filogenético.

Se realizó la secuenciación del microorganismo con mayor tasa de degradación de CH₄ y acumulación de PHB a través de la siguiente metodología, el ADN genómico se aisló mediante el uso del kit de aislamiento Ultraclean microbial de ADN MoBio (MoBio Laboratorios, Carlsbad, CA, EE.UU.) según lo recomendado por el fabricante. El 16S rRNA gen fue amplificado por PCR utilizando los cebadores Bac8f (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') y 1492r (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') cada 25 µl mezcla de reacción contenía 20 ng de DNA templado, 1x buffer de reacción ThermoPol (New England Biolabs, Ipswich, MA), 0.2 mM de cada trifosfato de desoxinucleósido, 0.5 µM de cada cebador, y 1.25 U de Taq polimerasa (New England Biolabs). Las mezclas de PCR fueron sometidas a (i) 2 min a 95 °C, (ii) 35 ciclos de 45 s a 94°C, 30 s 56°C y 1 minuto en a 72°C, y (iii) 5 min a 72°C en un termociclador TC-3000 (Techne, Burlington, NJ, USA). El producto de PCR fue purificado con el kit PCR Clean-up de purificación de ADN UltraClean (MoBio laboratorios, Solana Beach, CA, EE.UU.) según los protocolos. El producto de PCR purificado se clonó utilizando el kit

de clonación TA pCR2.1-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.), según los requisitos de manufactura con una inserción a la relación vector de 3:1 y transformado en células competentes XL1-Blue (método CaCl_2).

El fragmento del gen 16S rRNA se secuenció utilizando los cebadores Bac8f, F1.1 (5'-CAG CAG CCG CGG TAA TAC-3'), F3 (5'-AAA CTC AAA GGA ATT GAC GG-3'), Univ529r (5'-ACC GCG GCK GCT GGC-3'), R4 (5'-CCG TCA TCA AAC TTG AGT TT-3') y 1492r; la secuenciación se realizó en el Instituto de Biotecnología-UNAM (Cuernavaca, México).

Las secuencias de ADN se analizaron con la herramienta de VecScreen resident en el Centro Nacional de Información sobre Biotecnología (NCBI, sitio web) para eliminar las secuencias del vector. El 16S rRNA secuencias de genes obtenidos se compararon con los de NCBI, y algunas bases de datos como Greengenes GenBank utilizando el algoritmo de búsqueda de alineamiento local básica (BLAST). Las secuencias de nucleótidos de 16S rRNA codificación de los genes fueron recuperados de la Ribosomal Database Project, GenBank y Green Gens. El programa CLUSTAL W (Thomson et al., 2004) se utilizó para llevar a cabo la alineación de múltiples secuencias y se construyó un árbol filogenético usando el método neighbor-joining (Saitou et al., 1987); se realizó el análisis de la genética molecular evolutiva en el programa MEGA 3.1 (Kumar, 2004). La topología de árbol se evaluó por análisis de arranque (Felsenstein et al., 1985) sobre la base de 1000 repeticiones. La secuencia obtenida se depositó en el GenBank con el número de acceso HM589050.

4.2 Estudios en microcosmos

4.2.1 Degradación de CH_4 y acumulación de PHA

La degradación de CH_4 y la capacidad de acumulación de PHA de cada una de las cepas aisladas se probaron en ensayos utilizando botellas serológicas de vidrio de 125 ml selladas con válvulas Mininert (VICI, Baton Rouge, LA, USA) que contenían 25 ml de medio de MSM y el 10 % de CH_4 en el espacio de cabeza. La concentración inicial de biomasa fue de 80 g m^{-3} . Las tasas de consumo se determinaron utilizando el modelo de Gompertz (Acuña et al., 1999). Las botellas se incubaron a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ y 180 rpm durante 10 días. El consumo de CH_4 y la producción de CO_2 se midieron por

cromatografía de gases (GC) tal como se describe a continuación. Para los experimentos de acumulación de PHA, se utilizaron las mismas condiciones de cultivo, excepto que se utilizó el WM en lugar del medio de MSM y el cultivo se extendió a 45 días. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado. Se seleccionaron los microorganismos con la mayor capacidad de degradación de CH₄ y acumulación de PHA. La cepa *Methylosinus trichosporium* se utilizó como cepa control y referencia de resultados.

4.2.2 Consumo de cosustratos

Se realizaron pruebas de crecimiento por triplicado en matraces de 125 mL con 25 mL de MSM a pH 7.0. Los matraces sellados con válvulas Mininert (VICI, Baton Rouge, LA, USA) y se incubaron a 30 °C y 150 rpm durante 14 días. Inicialmente se realizaron pruebas para confirmar que *M. organophilum* CZ-2 crecía tanto en citrato o propionato. A continuación, los experimentos se llevaron a cabo con los cosustratos y CH₄ al 10 % v v⁻¹, que corresponde a 49 g m⁻³ en la fase de gas o 1.48 g m⁻³ en líquido. Los controles se realizaron con los cosustratos con y sin CH₄ (10 %) y sin cosustratos. La concentración inicial de biomasa fue de 30 g m⁻³.

Experimentos de acumulación de PHA bajo limitación de nitrógeno se realizaron por triplicado, con las siguientes condiciones: a) CH₄ 10 %, b) 0.25 g de citrato por L, c) CH₄ 10 % y citrato 0.25 g L⁻¹, d) propionato 0.25 g L⁻¹ y e) propionato 0.25 g L⁻¹ y CH₄ 10 %. Los matraces se airearon para evitar la limitación de oxígeno y el CH₄ fue repuesto cada vez que se realizó este procedimiento regresando a la concentración inicial. La concentración inicial de biomasa fue de 80 g m⁻³ para los experimentos con CH₄, y mezclas con cosustratos; mientras los controles de propionato y citrato tuvieron 200 g m⁻³.

4.3 Estudios en Bioreactores

4.3.1 Estudios de eliminación de CH₄ y acumulación de PHA en reactores de partición de dos fases líquidas

Los experimentos con el consorcio metanotrófico se realizaron en un fermentador Bioflo III (New Brunswick, Champaign, IL, USA), al tiempo que los experimentos con la cepa se realizaron en un fermentador ez-control (Applikon, Schiedam, Holanda Meridional, Netherland). Ambos reactores tenían volumen de trabajo 2 L y un volumen total de 3 L, con una agitación de 500 rpm, el flujo de gas fue de 0.42 L min⁻¹, con un

tiempo de residencia de 4.9 min, la carga promedio de CH₄ fue 80 g m⁻³ h⁻¹. En algunos experimentos, se utilizó aceite de silicón como la fase orgánica sustituyendo el 10 % en volumen del medio de cultivo. El efecto de la adición de aceite de silicón y la limitación de nitrógeno sobre la eliminación de CH₄ y acumulación de PHA se pusieron a prueba con el consorcio, mientras que para la cepa CZ-2 ambos efectos fueron probados simultáneamente.

4.3.2 Experimentos con adición de cosustratos

Para estos experimentos se operó el bioreactor control ez (Applikon, Schiedam, Holanda del Sur, Netherland) a 500 rpm, pH 7,0 y 30 °C. El flujo de gas fue de 0.42 L min⁻¹ y la carga promedio de CH₄ fue de 42 g m⁻³ h⁻¹. Se utilizaron dos litros del MSM con una concentración inicial de NaNO₃ de 80 g m⁻³ para promover la acumulación de PHA. En los experimentos con adición de citrato, su concentración inicial fue de 250 g m⁻³ y la biomasa inicial fue de 80 g m⁻³. Para los ensayos de propionato, las concentraciones fueron 250 g m⁻³ y 60 g m⁻³ para el propionato y la biomasa, respectivamente.

4.4 Métodos analíticos

4.4.1 Determinación de CH₄ y CO₂

Las concentraciones de CH₄ y CO₂ se analizaron por GC usando un cromatógrafo de gases Agilent 6890N (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipado con un detector de ionización de flama y un detector de conductividad térmica, respectivamente, utilizando las mismas condiciones de operación previamente reportadas por Rocha-Ríos et al., 2009.

4.4.2 Determinación de biomasa

La concentración de biomasa, X, se obtuvo a partir del contenido de proteínas medido por el método de Lowry teniendo considerando una fracción proteica de 50 % en la biomasa activa. Se preparó una curva estándar con suero albúmina bovina.

4.4.3 Determinación de nitrógeno

La determinación de nitrógeno (N-NO₃) se llevó a cabo mediante un método espectrofotométrico (Mubarak et al., 1977).

4.4.4 Determinación de PHA

La capacidad de almacenamiento de PHA se determinó cualitativamente mediante tinción con azul Nilo y observación al microscopio de epifluorescencia BH2 - RFCA (Olympus Corporation, Shinjuku, Tokio, Japón) (Ostle y Holt, 1982). Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 360 y 420 nm, respectivamente.

La determinación cuantitativa de PHA se llevó a cabo mediante la adaptación de dos métodos (Braunegg et al., 1978 y Riis y Mai, 1988). Tres mililitros de medio líquido del reactor se centrifugaron a 10,000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se desechó y a la biomasa se agregaron 0.8 ml de propanol con 0.2 ml de HCl, posteriormente se añadieron 2 ml de cloroformo, se incubó durante 4 horas a 110 °C. Después de enfriar a temperatura ambiente, se agregó 1 ml de agua desionizada y se agitó en un vortex durante 1 min. Después de la separación de las dos fases, se colectó la fase orgánica (inferior) y 1 ml de la muestra se analizó por CG. La temperatura del horno, el inyector y detector fueron de 160, 200 y 250 °C, respectivamente. El tiempo de retención de PHB fue de 3.2 min y el límite de detección fue de 80 g m⁻³.

El análisis fluorométrico de PHA se realizó utilizando 2 ml de medio de cultivo mezclado con 40 µl de una solución de rojo del Nilo en acetona (250 mg L⁻¹) y medida en un fluorómetro Turner Designs Trilogy, modelo 7200-000 (Sunnyvale, CA, USA) equipado con una lámpara con longitudes de onda de excitación-emisión de 485 y 525 nm. La curva estándar se preparó con PHB en polvo.

4.4.5 Resonancia Magnética Nuclear y Calorimetría.

El análisis de RMN se llevó a cabo en un equipo Bruker DMX 500 MHz (Bellerica, MA, USA) usando cloroformo deuterado como disolvente. Los desplazamientos químicos de hidrógeno y de carbono se midieron a 25 °C, con el estándar de PHB-V, que contiene 12 % de HV, y los espectros de ¹³C y ¹H se obtuvieron a 500 y 125 MHz, respectivamente. Los espectros se analizaron utilizando el programa de versión MestRe NOVA 7.

Los experimentos de calorimetría se realizaron en un calorímetro diferencial de barrido Perkin Elmer DSC 4000 (Waltham, MA, USA). Las muestras (4 mg aprox.) se enfriaron a 0 °C y se mantuvieron a esa temperatura por 5 min, después se calentaron a 180 °C para borrar la historia térmica. Posteriormente fueron enfriados rápidamente a 0 °C, se mantuvo durante 5 min, y se calentaron lentamente hasta 180 °C. La rampa de calentamiento fue de 5 °C min⁻¹. El ΔH fue calculado utilizando el software PyrusTM, se corrieron estándares de PHB y un copolímero de PHB-V 88:12, para validar el método ejecutado.

4.4.6 Determinación de cosustratos

El propionato se analizó por CG usando un HP5890 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) con un detector FID y la columna AT-1000, el flujo de N₂ (gas acarreador) fue 5 mL min⁻¹, aire 400 mL min⁻¹, H₂ 38 mL min⁻¹, con una rampa de temperatura del horno de 80 a 190 en el 25 °C por minuto, 250 y 250 °C para el detector y del inyector, respectivamente.

El citrato se cuantificó por HPLC (Waters 600 Controlador, Milford, MA, USA) a 230 nm con un espectrofotómetro UV Waters Detector de 2996, usando una columna Agilent Zorbax SB-AQ 4.6 mm DI x 150 mm (5 µm), Fase móvil 1 % de ACN / 99 % NaHPO₄ 20 mM, pH 2, velocidad de flujo 1,0 mL min⁻¹, y un régimen isotérmico a 35 °C.

4.5 Cálculos bioreactores

La degradación CH₄ en biorreactores se expresó en términos de la capacidad de eliminación de CH₄ volumétrica, $CE = (C_{CH_4,in} - C_{CH_4,out}) QV^{-1}$ y con eficiencia de remoción, $RE = 100 (C_{CH_4,in} - C_{CH_4,out}) C_{CH_4,in}^{-1}$. La tasa de producción de CO₂ se expresó en forma de $CO_2 = (C_{CO_2,in} - C_{CO_2,out}) QV^{-1}$. Donde $C_{CH_4,in}$, $C_{CO_2,in}$, $C_{CH_4,out}$ y $C_{CO_2,out}$ son las concentraciones de CH₄ y CO₂ a la entrada y salida respectivamente (g m⁻³), Q es el caudal volumétrico de gas (m³ h⁻¹) y V el volumen de la operación del reactor (m³).

La biomasa total, X_T , incluye tanto la concentración de biomasa (X) determinada a través de contenido de proteína más la concentración de PHA acumulada (PHA), $X_T = X + PHA$. El porcentaje de PHA contenido en la célula se calculó con respecto a la biomasa total como $y_{PHA} = 100 (PHA X_T^{-1})$. La tasa de acumulación de PHA (R_{PHA}) se determinó mediante ajuste los datos en el modelo de Gompertz y la productividad específica (q_{PHA}) se calculó mediante la siguiente ecuación: $q_{PHA} = R X^{-1}$ (mg_{PHA} g_X⁻¹ h⁻¹). La velocidad específica de consumo de CH₄ se calculó como $q_{CH_4} = EC X^{-1}$ (mg_{CH_4} g_X⁻¹ h⁻¹). La concentración de PHA y biomasa activa (X) se expresaron en g m⁻³. $Y_{x/s}$ se refiere al rendimiento de carbono de la biomasa activa con respecto al CH₄, citrato o propionato total consumido ΔS (g m⁻³) y la cantidad de biomasa producida ΔX (g m⁻³) $Y_{x,s} = \Delta X \Delta S^{-1}$ es el mismo caso para $Y_{p,s} = \Delta PHA \Delta S^{-1}$ y $Y_{CO_2,s} = \Delta CO_2 \Delta S^{-1}$.

4.6 Modelo metabólico a escala genoma

Como se mencionó anteriormente, el objetivo de este estudio fue representar la síntesis de PHA a partir de CH₄ desarrollando un modelo metabólico a escala del genoma, en este sentido también se propone evaluar metabólicamente la factibilidad de adicionar cosustratos realizando simulaciones *in silico*, con dos objetivos: 1. alcanzar mayores concentraciones de biomasa que eventualmente se convertirán en PHA, 2. Mejorar las características del PHA sintetizado.

Para realizar el modelo se siguió el protocolo para generar una reconstrucción de alta calidad a escala genoma (Thiele y Palsson, 2010), metodología dividida en 4 etapas.

4.6.1 Creando un borrador (Etapa 1)

1. Documentar y seleccionar el genoma de una especie de *Methylobacterium*, ya que el genoma de *Methylobacterium organophilum* CZ-2 no ha sido secuenciado ni reportado. Con el genoma de *Methylobacterium extroquens* BJ001 publicado por Marx et al., 2012, con número de acceso al GenBank NC_010725, se solicitó una reconstrucción preliminar del metabolismo al sitio web www.theseed.org, con el número de trabajo 105841. La página de internet "The seed" es un servicio totalmente automatizado para el estudio de genomas bacterianos. El servicio identifica los genes de ARNr y ARNt que codifican para la proteína, asignando funciones según los genes, también predice los subsistemas que están representados en el genoma, utilizando esta información para reconstruir la red metabólica generando una hoja de cálculo. El bosquejo de reconstrucción y el modelo publicado previamente por Peyraud et al. (2011) se utilizaron para la reconstrucción del modelo planteado.
2. Definir las funciones celulares que estarán presentes en el modelo, en este caso se contempló el metabolismo metanotrófico, ciclo de la serina, ciclo de los ácidos tricarboxílicos, ruta del etilmalonilo-CoA y la síntesis de PHA, principalmente.

4.6.2 Reconstrucción manual y refinamiento (Etapa 2)

La etapa de reconstrucción del modelo es la más laboriosa, ya que manualmente se realiza una revisión detallada de los bosquejos basada en la búsqueda bibliográfica de

todas las reacciones que se desean incluir en el modelo, al tiempo que se debe compaginar el número de las enzimas a las que corresponde cada reacción así como rectificar que todas las reacciones estén balanceadas; Thelie y Palsson, 2010, han realizado un listado consenso que contempla todos los detalles para una buena reconstrucción y refinamiento, los cuales se siguieron durante este trabajo.

1. Ensamblado del modelo con base en toda la bibliografía documentada y los bosquejos obtenidos.
2. Verificar que todas las funciones celulares deseadas estén presentes en el modelo.
3. Excluir las reacciones genéricas como: síntesis o degradación de proteínas, ADN y aceptores de e⁻.
4. Definir los sustratos y cofactores presentes en la ruta.
5. Documentar todas las fórmulas químicas en la versión cargada de cada metabolito.
6. Revisar la estequiometría y direccionalidad de las reacciones.
7. Documentar la localización de las reacciones y definir los compartimentos.
8. Introducir las reacciones espontáneas y de transporte.
9. Determinar la composición del producto de interés en la mayoría de los modelos la función objetivo corresponde a la composición de biomasa y se determina con base en la cantidad de diferentes aminoácidos, cofactores, lípidos y otras macromoléculas, en este caso la función objetivo es la composición del polímero de PHA almacenado, la cual fue identificada por RMN, y cuantificada por CG.
10. Se incluyeron en el modelo reacciones de mantenimiento de ATP que no están asociadas al crecimiento.
11. En cuanto a los requerimientos del medio de cultivo se utilizó el medio MSM durante el crecimiento de la biomasa y el medio MW para propiciar la síntesis de copolímeros. Considerando así que los metabolitos relacionados con el crecimiento se mantienen constantes durante la etapa de almacenamiento de polímeros.

4.6.3 Convirtiendo la reconstrucción al modelo matemático (Etapa 3)

Durante esta etapa el modelo se construyó en formato Excel según los requerimientos de Agren et al. (2013), para poder convertir el archivo a SBML. De igual forma se

incluyeron las restricciones que tendría el modelo, el tipo de restricciones incluidas son límites inferior y superior (Tabla 4-1) y la reversibilidad o irreversibilidad de las reacciones también se incluyó en el modelo.

Tabla 4-1. Restricciones del modelo.

Reacciones	Restricciones del flujo
metano[Externo] => metano[Periplasma]	$-\infty \leq \text{metano}_{\text{consumido}} \leq 0$
metanol[Externo] => metanol[Periplasm]	$-\infty \leq \text{metanol}_{\text{consumido}} \leq 0$
citrato[Externo] => citrato[Citoplasma]	$-\infty \leq \text{citrato}_{\text{consumido}} \leq 0$
propionato[Externo] => propionato[Citoplasma]	$-\infty \leq \text{propionato}_{\text{consumido}} \leq 0$
glioxilato[Externo] => glioxilato[Citoplasma]	$-\infty \leq \text{glioxilato}_{\text{consumido}} \leq 0$
acetato[Externo] => acetato[Citoplasma]	$-\infty \leq \text{acetato}_{\text{consumido}} \leq 0$
succinato[Externo] => succinato[Citoplasma]	$-\infty \leq \text{succinato}_{\text{consumido}} \leq 0$
fumarato[Externo] => fumarato[Citoplasma]	$-\infty \leq \text{fumarato}_{\text{consumido}} \leq 0$
formato[Externo] => formato[Citoplasma]	$-\infty \leq \text{formato}_{\text{consumido}} \leq 0$

4.6.4 Evaluación de la ruta (Etapa 4)

1. Evaluar la reconstrucción, utilizando una computadora personal estándar que puede ejecutar Matlab.
 - Matlab R2013b (Mathwork Inc.) fue instalado y utilizado.
 - Se instaló COBRA Toolbox versión 1.3.4 que se proporciona en <http://systemsbiology.ucsd.edu/downloads/COBRAToolbox>; también se instaló SBML Toolbox para Matlab que permite la lectura de modelos en formato SBML (<http://sbml.org/Software/SBMLToolbox>).
 - Es necesario también un solucionador de Programación lineal (LP). Múltiples solucionadores son soportados actualmente por el COBRA Caja de herramientas:
 - a) GLPK (freeware) : <http://www.gnu.org/software/glpk/>
 - b) API LINDO (LINDO Systems Inc.) <http://www.lindo.com>
 - c) CPLEX (ILOG Inc.) a través del entorno de optimización Tomlab (Tomlab Optimization Inc.) <http://tomopt.com/>
 - d) Mosek (Mosek ApS) <http://www.mosek.com>

- La librería SBMLFromExcel fue utilizada para convertir los archivos Excel a formato SBML, esta librería es gratuita y se encuentra en el sitio web www.sysbio.com, y forma parte de RAVEN (Agren et al., 2013).
 - Excel (Microsoft Inc., <http://office.microsoft.com/en-us/excel/default.aspx>)
2. Evaluar el modelo maximizando la función objetivo de síntesis de PHA.
Una vez que el modelo fue ejecutado correctamente se utilizó la librería SBMLFromExcel, para convertir el archivo extensión .xlsx (Excel) a .xml (SBML). Se ejecutó el comando `modelo=readCbModel('modelo.xml')` y se obtuvo la solución utilizando el comando `FBAsolution=optimizeCbModel(model, 'max')`.
 3. Conocimiento de los límites del modelo, se realizaron los siguientes estudios para determinar los alcances generales del modelo:

- a. Cálculo de Shadow prices utilizando los sustratos citrato, propionato, acetato, formato, fumarato, glioxilato y succinato.

Un shadow price es la velocidad a la que cambia de valor la función objetivo en respuesta a un aumento en el suministro de un recurso en particular, en el caso de una red metabólica, el recurso sería un metabolito. La estructura de los shadow prices es finita en número, dividiendo el plano formado por los niveles de flujo a través de las dos reacciones de interés en fases. Las líneas en el plano de fases separan estas fases, que corresponden a los cambios en los shadow prices (Eq 4-1 y 4-2).

$$\text{Definición de Shadow Price } \pi_i = - \left. \frac{\partial Z}{\partial b_i} \right|_{\text{lim}} \quad (4-1)$$

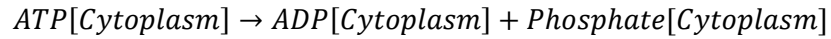
$$\text{Shadow Price relativo } \alpha = - \frac{\gamma_A}{\gamma_B} = - \frac{dZ/db_A}{dZ/db_B} = \frac{db_B}{db_A} \quad (4-2)$$

El shadow price es la sensibilidad de la función objetivo (Z) a los cambios en la disponibilidad de metabolitos (el vector b define el lado correcto de las restricciones en los balances de masa). El valor numérico en el shadow price puede ser negativo, cero o positivo, dependiendo del valor intrínseco del metabolito. Puede definirse una relación de los shadow prices entre los dos metabolitos externos.

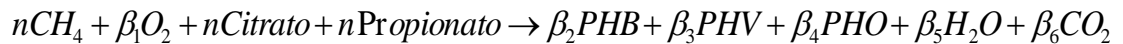
El signo negativo en α se introduce en previsión de su interpretación. La relación α es el cambio relativo en la función objetivo de los dos flujos de intercambio claves. Para que la función objetivo se mantenga

constante, un aumento en uno de los flujos de intercambio estará acompañado por una disminución en el otro y así introducimos el signo negativo en la definición de α .

- b. Cálculo de rendimientos estequiométricos de PHA según el modelo.
- c. Análisis de la energía almacenada en forma de PHB y un copolímero de PHB-V-O (78:13:9), utilizando como función objetivo la reacción:



- d. Posteriormente se realizó un estudio termodinámico donde se evaluaron las reacciones generales de producción de PHB y el copolímero de PHB-V-O (78:13:9). Utilizando como coeficientes del vector de flujos metabólicos obtenidos a partir de FBAsolution.x, la ecuación general que se siguió fue:



Se calculó el ΔG° por contribución de grupos para cada metabolito, y se corrigió, utilizando las siguientes ecuaciones (Eq. 4-3 y 4-4), ρ representa el coeficiente estequiométrico correspondiente a cada reactivo o producto.

$$\mu = \mu^{\circ} + RT \ln \frac{C}{C_{Re f}} \quad (4-3)$$

$$\Delta G_r^{\circ} = \sum \rho \mu_{prod} - \sum \rho \mu_{reactivos} \quad (4-4)$$

4. Análisis del rendimiento respecto al flujo total para cada sustrato, el objetivo de esta prueba fue estudiar el modelo y los requerimientos en forma de flujos correspondientes a cada reacción que presenta cada uno de los sustratos propuestos, se analizó el resultado de la función objetivo (Z) y se dividió entre la sumatoria del absoluto de los flujos (Σ IFBAsolution.xl). Este análisis estuvo acompañado de un estudio de costos monetarios de cada cosustrato, con la finalidad de seleccionar los cosustratos más apropiados para la síntesis de PHA bajo condiciones de metanotrofia. Los cosustratos fueron seleccionados con base en la lista de metabolitos de modelo, según su disponibilidad en el mercado.

5. Validación del modelo, comparación de las propiedades fisiológicas con las propiedades teóricas del modelo. Con los cosustratos seleccionados se realizaron los siguientes análisis:
 - a. Se simularon diferentes composiciones de polímero, utilizando diferentes cantidades de cosustratos; comparando los resultados experimentales con los valores obtenidos utilizando el modelo.
 - b. Se programó en Matlab el cálculo de diferentes soluciones para las mezclas de CH_4 y los cosustratos seleccionados. Con el objetivo de obtener planos de fase que describan una línea de optimalidad para la síntesis de PHB y mezclas de PHA.

5. RESULTADOS Y DISCUSION

5.1 Aislamiento, identificación, degradación de CH₄ y acumulación de PHB en microcosmos y bioreactores.

5.1.1 Aislamiento de bacterias a partir del consorcio metanotrófico

Se obtuvieron diez aislados del consorcio metanotrófico usando CH₄ como única fuente de carbono. Entre éstos, sólo cuatro acumularon PHA como se reveló en la tinción con Azul del Nilo observado en microscopio de epifluorescencia. Una bacteria, denominada CZ-2, presentó, una alta acumulación PHB y una alta degradación de CH₄; así se seleccionó a ese organismo para su caracterización fisiológica e identificación por técnicas de biología molecular además de su estudio en microcosmos y reactores.

5.1.2 Identificación del aislado CZ-2 y caracterización en microcosmos

Se obtuvo la secuencia casi completa del gen del 16S rRNA (1440 pb) de la CZ-2 y se encontró que era similar a la de *Methylobacterium organophilum* NS7 con una identidad de secuencia de 99.9 %. Se construyó un árbol filogenético usando el método neighbor joining y de igual manera se observa que el aislado CZ-2 tiene gran similitud con *M. organophilum* (Figura 4-1).

Se comparó la tasa específica de consumo de CH₄ y la capacidad de acumulación de PHB en microcosmos para *M. organophilum* CZ-2 y *Methylosinus trichosporium* OB3b, los resultados se muestran en la Tabla 5-1. Como se puede observar *M. organophilum* CZ-2 acumuló el 57 % (g g⁻¹) de PHB con una biomasa residual (80 g m⁻³) y una tasa específica de consumo de CH₄ (q_{CH4}) de 60 mg_{CH4} g_X⁻¹ h⁻¹ en comparación con el 25% (g g⁻¹) de PHB acumulado para *M. trichosporium* OB3b y q_{CH4} de 78 mg_{CH4} g_X⁻¹ h⁻¹.

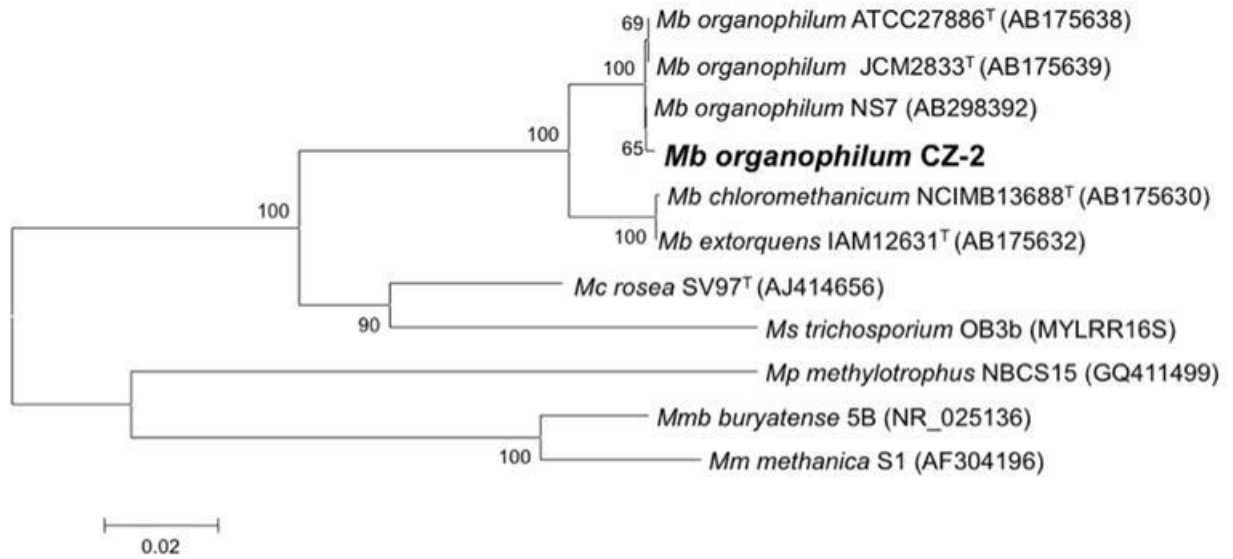


Figura 5-1. Árbol filogenético, basado en la secuencia 16S rRNA de genes casi completos; se muestran las relaciones entre CZ-2 y algunas especies y géneros relacionados de bacterias metilotróficas. Los números en los nodos indican los valores de arranque de 1000 réplicas. Los números de acceso al GenBank se muestran entre paréntesis. La barra representa el 0.2 % estimado de divergencia de cada secuencia. Mb, *Methylobacterium*; Mc, *Methylocystis*; Ms, *Methylosinus* Mf, *Methylophilus*; Mmb, *Methylomicrobium*; Mm, *Methylomonas*.

Tabla 5-1. Tasa específica de consumo de CH₄ y la capacidad de acumulación de PHB de *Methylobacterium organophilum* CZ-2 comparada con *Methylosinus trichosporium* OB3b.

Cepa	q _{CH₄} [mg _{CH₄} g _x ⁻¹ h ⁻¹]	q _{CO₂} [mg _{CO₂} g _x ⁻¹ h ⁻¹]	PHB* Acumulado
<i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b	77.8±3.89	90.0±5.24	24.5±4.2
<i>Methylobacterium organophilum</i> CZ-2	60.0±1.62	32±2.34	56.9±2.5

* El porcentaje de PHB fue calculado por $(PHB \cdot X_T^{-1} \cdot 100)$; $X_T = PHB + X$

5.1.3 Eliminación de CH_4 por consorcio metanótrofico en biorreactores bajo condiciones de crecimiento o limitación por nitrógeno.

Los experimentos se llevaron a cabo bajo condiciones de crecimiento para comparar el efecto de aceite de silicón sobre la eliminación de CH_4 cuando los microorganismos del consorcio estuvieron presentes. Dos experimentos se llevaron a cabo con una concentración de biomasa inicial de 1270 g m^{-3} con y sin aceite de silicón (10 %). La figura 5-2 muestra los resultados de CE, la producción de CO_2 y q_{CH_4} . El efecto de la adición de aceite de silicón se observó desde el inicio del experimento, ya que se mejoró la disponibilidad de CH_4 lo que permitió un aumento de la CE, ER, y la producción de CO_2 .

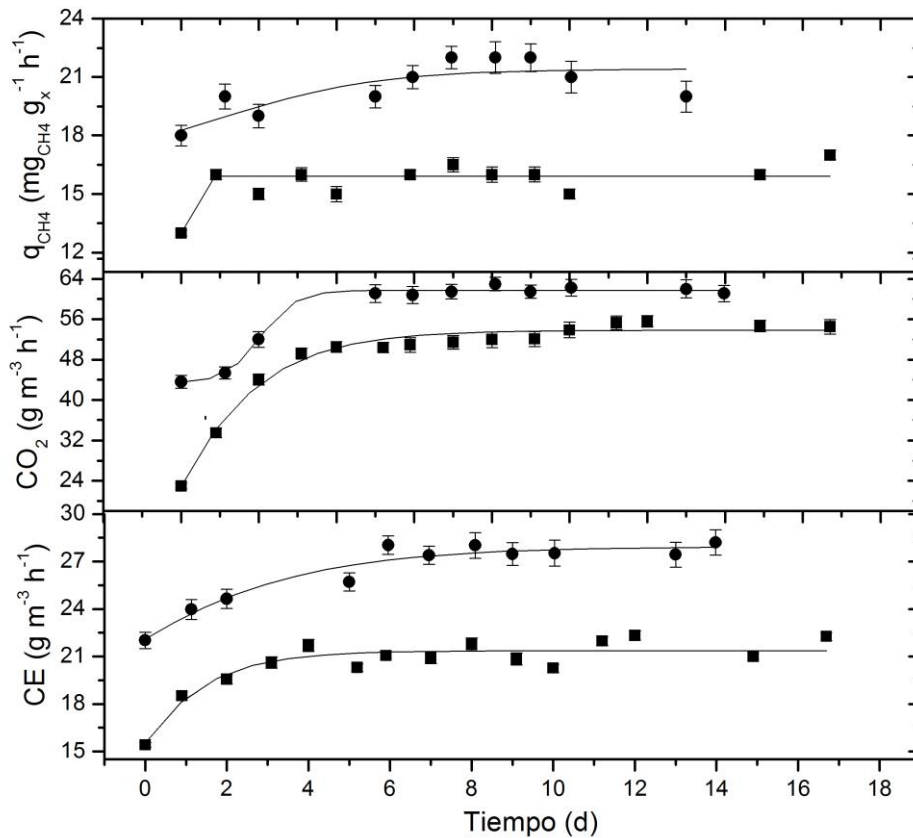


Figura 5-2. Evolución de la capacidad de eliminación de la CE, la producción de CO_2 y la tasa de degradación específica, q_{CH_4} , en el STR inoculado con el consorcio (■) y TPPB con aceite de silicona al 10 % (●).

El estado estacionario en el sistema TPPB se alcanzó al sexto día, y presentó un incremento del 25 % aproximadamente en la CE, el ER y la tasa específica de consumo de CH_4 , mientras que la producción de CO_2 también se incrementó en un

18 % con respecto al control (experimento sin aceite de silicón). La concentración de biomasa final fue de 50 g m^{-3} en el reactor sin aceite de silicón y 75 g m^{-3} en el TPPB.

La capacidad del consorcio para acumular PHB con limitación de nitrógeno se muestra en la Figura 5-3. Este experimento se llevó a cabo con una concentración inicial de biomasa activa (es decir, calculada a partir de su contenido de proteína) de 1.16 g m^{-3} que no cambió durante todo el experimento debido a la limitación de nitrógeno.

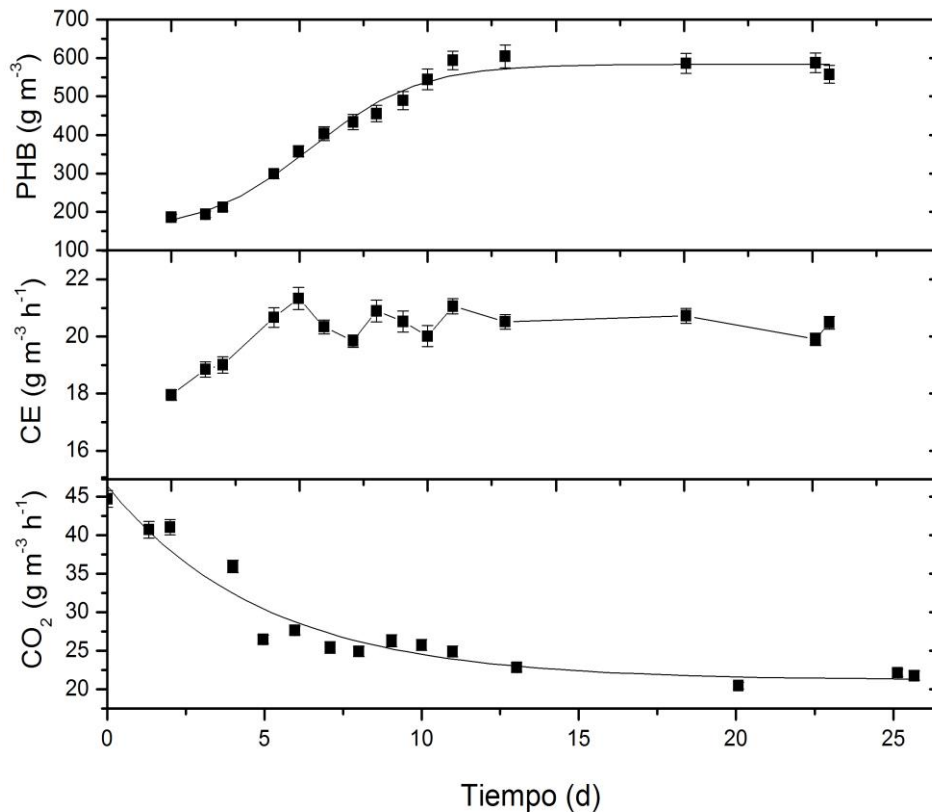


Figura 5-3. La acumulación de PHB, la CE y la producción de CO_2 en el STR inoculados con el consorcio.

La CE fue de aproximadamente $21 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$, siendo similar a la obtenida en condiciones de crecimiento. La producción de CO_2 fue de $45 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ inmediatamente después de la inoculación y poco a poco se redujo a $22 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ en el día 12. La concentración de PHB aumentó después de un corto período de demora de un valor inicial de alrededor de 180 a 600 g m^{-3} en el día 12 que corresponde a un 34 % (g g^{-1}).

5.1.4 Eliminación de CH₄ y la acumulación de PHB por *M. organophilum* CZ-2 en biorreactores bajo condiciones de crecimiento y de limitación por nitrógeno.

La tasa específica de consumo de CH₄ de *M. organophilum* CZ-2 se determinó en condiciones de crecimiento. La inoculación de biomasa activa en experimentos para la acumulación de PHB se realizó con una concentración inicial de 450 g m⁻³. La Figura 5-4 muestra la comparación entre *M. organophilum* CZ-2 y el consorcio metanotrófico, incluyendo X, ER y CO₂.

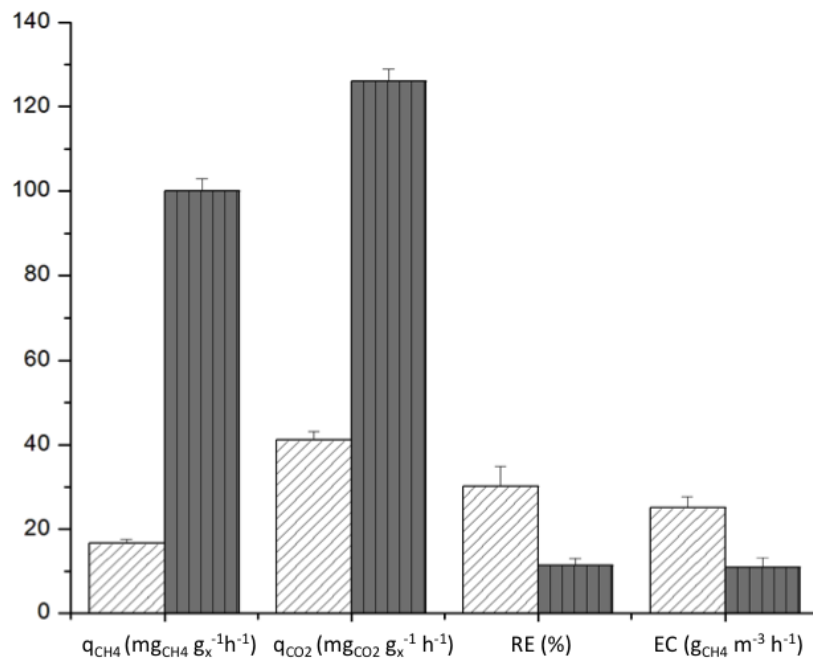


Figura 5-4. Consorcio (líneas diagonales), *M. organophilum* CZ-2 (líneas verticales) en el STR.

Como se puede observar, la tasa específica de consumo de CH₄ de *M. organophilum* CZ-2 fue de 100 mg_{CH₄}g_X⁻¹ h⁻¹ en comparación con los 17 mg_{CH₄} g_X⁻¹ h⁻¹ del consorcio (casi seis veces más alta) con una ER del 11.5 %. Además, la producción de CO₂ de *M. organophilum* CZ-2 fue de 126 mg_{CH₄} g_X⁻¹ h⁻¹ en comparación con el 41 mg_{CO₂} g_X⁻¹ h⁻¹ para el consorcio.

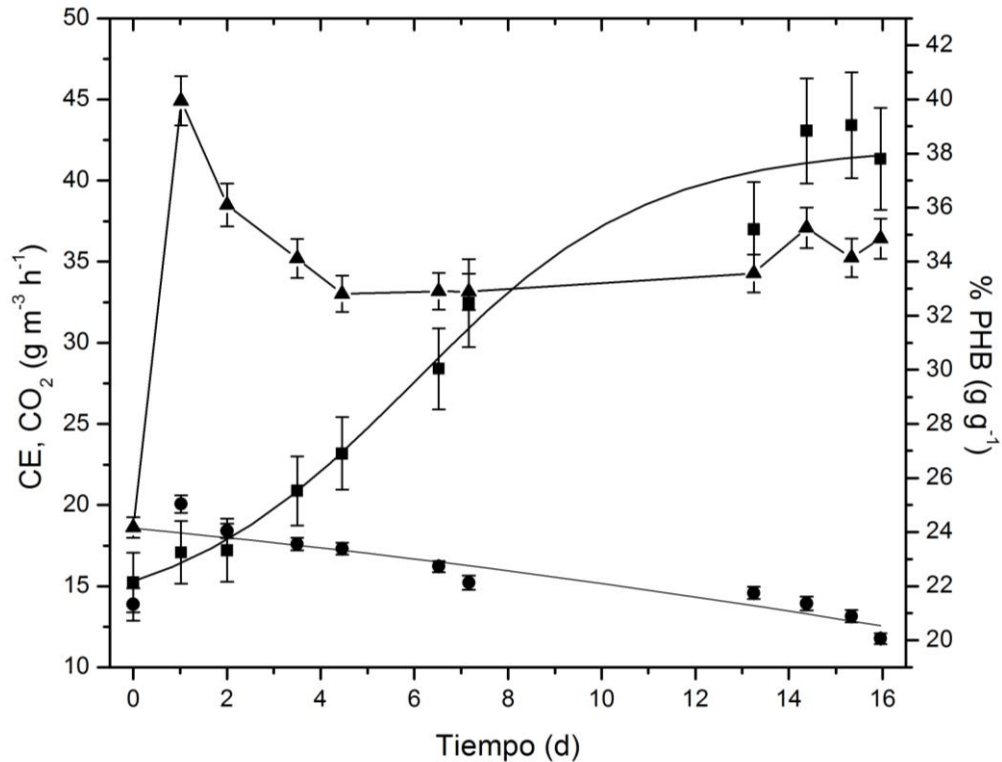


Figura 5-5. CE (▲), la producción de CO₂ (●) y la acumulación de PHB (■) como función del tiempo en el STR por *M. organophilum* CZ-2.

La Figura 5-5 muestra la CE la tasa de producción de CO₂ y la acumulación de PHB por *M. organophilum* CZ-2 bajo limitación de nitrógeno. La CE aumentó inicialmente a 45 g m⁻³ h⁻¹ probablemente debido al nitrógeno residual, pero fue disminuyendo hasta alcanzar un estado estable alrededor de 36 g m⁻³ h⁻¹ y un 39 % (g g⁻¹) de contenido de PHB.

Como se puede observar, la producción de CO₂ se redujo 50 % lo cual estuvo relacionado con el hecho de que parte del carbono se destinó para la acumulación de PHB, finalmente el porcentaje de remoción se mantuvo en 25 %. La concentración de PHB aumentó, pasado de 100 a 275 g m⁻³ con una concentración total de biomasa de 725 g m⁻³.

La Tabla 5-2 muestra los balances de carbono de los experimentos con el consorcio y *M. organophilum* CZ-2 tanto en condiciones de crecimiento como bajo limitación de nitrógeno.

Tabla 5-2. Balances de carbono del consorcio y *M. organophilum* CZ-2, bajo las diferentes condiciones de operación experimentadas.

	CH₄	CO₂	Biomasa	PHB
Consortio bajo condiciones de crecimiento,STR				
Carbono (g m ⁻³)	261.60	229.30	50.00	----
Rendimiento		0.80	0.19	----
Consortio bajo condiciones de crecimiento, TPPB				
Carbono (g m ⁻³)	277.40	222.80	75.00	----
Rendimiento		0.80	0.20	----
Consortio limitado por nitrógeno, TPPB				
Carbono (g m ⁻³)	390.60	182.40	----	233.30
Rendimiento		0.40	----	0.60
<i>Methylobacterium organophilum</i> CZ-2 bajo condiciones de crecimiento, STR				
Carbono (g m ⁻³)	249.92	75.00	140.00	----
Rendimiento		0.30	0.56	----
<i>Methylobacterium organophilum</i> CZ-2 limitada por nitrógeno, STR				
Carbono (g m ⁻³)	221.95	67.90	----	96.90
Rendimiento		0.30	----	0.43
<i>Methylobacterium organophilum</i> CZ-2 limitada por nitrógeno, TPPB				
Carbono (g m ⁻³)	251.00	131.00	----	90.00
Rendimiento		0.50	----	0.35

El carbono del CH₄ consumido se transformó en PHB, CO₂ y biomasa en ambos experimentos con y sin aceite de silicón. No hubo generación neta de la biomasa (X) en la fase de acumulación de PHB debido a las condiciones limitantes en nitrógeno. El $Y_{x,s}$ en condiciones de crecimiento fue de 0.2 para el consorcio y el 0.6 por *M. organophilum* CZ-2. En ambos casos, el carbono restante se convierte en CO₂. Para los experimentos de limitación de nitrógeno con *M. organophilum*, los balances de carbono explican sólo 73 % y 85 % del CH₄ consumido en el STR y la TPPB, respectivamente. Esta diferencia puede deberse a los polímeros extracelulares excretados como ha sido reportado por Brenner et al., (2005) en bacterias metanotróficas.

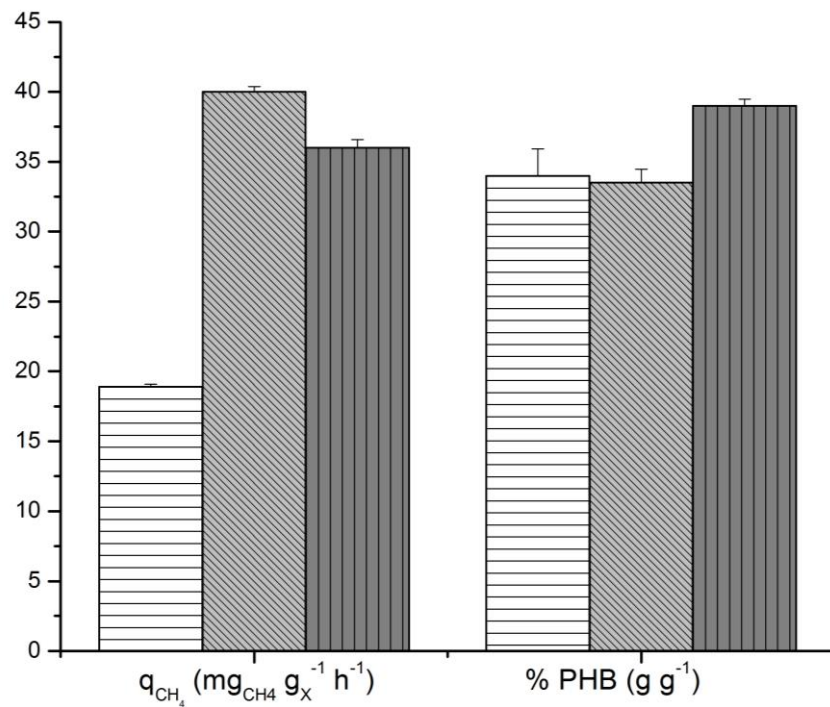


Figura 5-6. q_{CH_4} y acumulación de PHB, consorcio en el STR (líneas horizontales), *M. organophilum* CZ-2 en TPPB (líneas diagonales), *M. organophilum* CZ-2 en STR (líneas verticales).

Los resultados de los experimentos bajo limitación de nitrógeno se muestran en la Figura 5-6. En todos los experimentos *M. organophilum* CZ-2 presentan un mejor comportamiento que el consorcio. Los valores más altos de q_{CH_4} y acumulación de PHB fueron $37 mg_{CH_4} g_x^{-1} h^{-1}$ y un 39 % ($g g^{-1}$), respectivamente. Los valores obtenidos (q_{CH_4}) en el STR, $36 mg_{CH_4} g_x^{-1} h^{-1}$, y con aceite de silicón $37 mg_{CH_4} g_x^{-1} h^{-1}$, fueron similares. No hubo variación significativa en el contenido de PHB (alrededor de 38 %) en presencia de aceite de silicón.

5.1.5 Discusión

El consorcio metanotrófico previamente reportado por Rocha-Ríos et al. (2009) fue capaz de degradar CH_4 y se observó un incremento en la q_{CH_4} ($26 mg_{CH_4} g_x^{-1} h^{-1}$) cuando al sistema se le agregó aceite de silicón con respecto al valor obtenido ($16 mg_{CH_4} g_x^{-1} h^{-1}$) sin aceite de silicón.

En este estudio se demostró que este consorcio y la cepa CZ-2, identificada como *M. organophilum*, aislada del mismo presentó un aumento de la tasa de degradación de CH₄ y la capacidad de acumular PHB.

M. organophilum CZ-2 tiene una q_{CH_4} de $100 \text{ mg}_{\text{CH}_4} \text{ g}_x^{-1} \text{ h}^{-1}$, que es cuatro veces mayor que el valor obtenido con el consorcio y *Methylosinus trichosporium* OB3b reportado como uno de los mejores degradadores de CH₄ con una tasa entre 39 y $50 \text{ mg}_{\text{CH}_4} \text{ g}_x^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Shah et al., 1996; Rodríguez et al., 2009). Otros estudios de degradación de CH₄ utilizando diferentes consorcios tienen valores que oscilan entre 10^{-1} y $10 \text{ mg}_{\text{CH}_4} \text{ g}_x^{-1} \text{ h}^{-1}$, que son más bajos en comparación con los obtenidos por CZ-2 (Watanabe et al., 1997; Rocha-Ríos et al., 2009).

M. organophilum CZ-2 acumuló hasta el 57 % de PHB (Tabla 5-1) en experimentos de microcosmos mientras que en biorreactores se observó un valor de 39 % (Tabla 5-3). Esta diferencia puede explicarse, en parte, por la duración del experimento, en microcosmos fue de 45 días, mientras que en el biorreactor duró sólo 16 días.

El valor máximo de acumulación de PHB observado para el aislado CZ-2 es mayor que los valores obtenidos por otros metilótrofos como *Methylobacterium extorquens*, *rhodesianum*, *Methylocystis* sp., y *Methylobacterium* sp. GW2 (Yezza et al., 2006) cuando utilizan metanol como fuente de carbono, y algunos heterótrofos como *Bacillus megaterium*, *Sphaerotilus natans* y *Wautersia eutropha* que utilizan octanoato, propionato como fuente de carbono (Bourque et al., 1995; Helm et al., 2006). Algunos informes de BIOPOL, uno de los productores más importantes de PHB a escala industrial, muestran que es necesario alcanzar un mínimo de 40 % de la acumulación de PHB para alcanzar viabilidad económica (BIOPOL, 2009).

La cepa aislada CZ-2 tiene una acumulación de PHB similar a los valores reportados para otras cepas *M. organophilum* entre 52 % y 56 % (g g^{-1}) en metanol (Kim et al., 1996; Dedysh et al., 2004), sin embargo no hay reportes acerca de alta acumulación de PHB con *M. organophilum* usando CH₄ como única fuente de carbono. Un balance económico realizado por Choi y Lee (1997) mostró que el costo del sustrato constituye el 30 % de los costos de producción; una alternativa podría ser usar CH₄ como sustrato para la producción de PHB ya que es gratuito, además es importante considerar que las emisiones de CH₄ proveniente de fuentes fijas tienen un alto impacto ambiental y en corrientes diluidas menores al 5 % no se le puede usar como combustibles. Los inconvenientes asociados con el uso de CH₄ como sustrato están relacionados con su alto coeficiente de partición, asociado a su una baja solubilidad, limitando la transferencia de masa y eventualmente el crecimiento del microorganismo.

Una manera de demostrar las limitaciones del uso de CH₄ por ejemplo es cuando se usa CH₄ al 5 % (alrededor de 25 m g⁻³), valor cercano al límite inferior de explosividad del CH₄. El equilibrio en el líquido es aproximadamente 0.8 g m⁻³ y suponiendo un k_La con un valor de 40 h⁻¹ (Rocha-Ríos et al., 2010) arroja una transferencia volumétrica máxima de alrededor de 32 g m⁻³ h⁻¹ o 768 g m⁻³ d⁻¹. La mejora observada en la CE en experimentos con aceite de silicón está relacionada con el aumento de la disponibilidad de CH₄, asociado con la disminución del coeficiente de Henry.

El coeficiente global de partición para el CH₄ en el TPPB puede estimarse a partir de los coeficientes individuales para el CH₄ en agua (33.5) y en aceite de silicón (3.2), teniendo en cuenta las fracciones utilizadas para aceite de silicón (0.1) y la fase acuosa (0.9); concluyendo con un coeficiente de partición en el sistema de 17 lo que sugiere que el CH₄ disponibles aumentó 2 veces. Este resultado es consistente con el aumento inicial de la eliminación de CH₄ y la producción de CO₂ en los experimentos realizados con el consorcio en condiciones de crecimiento (Figura 5-3). La Tabla 5-3 muestra los rendimientos de PHB obtenidos por otros autores cuando se utiliza metanol como la fuente de carbono.

Tabla 5-3. Comparación de la productividad de PHB entre microorganismos degradadores de metano y metanol, por diferentes especies de *Methylobacterium*.

Microorganismo	Sustrato	X (g L ⁻¹)	q _{PHB} (mg _{PHB} g _x ⁻¹ h ⁻¹)	PHB (%)	Referencia
<i>Methylobacterium extorquens</i> DSMZ 1340	Metanol	132	7.4 ± 0.3	35	Mokhtari-Hosseini et al. 2009
<i>Methylobacterium organophilum</i>	Metanol	172	10.2	28.9	Kim et al. 1996
<i>M. extorquens</i>	Metanol	107	4.4	42.5	Bourque et al. 1995
<i>Protomonas extorquens</i> *	Metanol	206	3.7	34	Suzuki et al. 1986
Consortium	Metano	1.17	1.83±0.074	34	Este estudio
<i>M. organophilum</i> STR	Metano	0.290	1.24 ± 0.050	39.5	Este estudio
<i>M. organophilum</i> TPPB	Metano	0.230	1.61 ± 0.073	33.5	Este estudio

* Reclassificada como *Methylobacterium extorquens*.

Las productividades específicas de la acumulación de PHB utilizando CH_4 como un sustrato son inferiores a las reportadas para el metanol, situación que puede estar relacionada con las limitaciones de transferencia de masa. Bajo limitación de nitrógeno, la CE fue la misma, pero la producción de CO_2 disminuyó debido a que el carbono se redirige a la producción de PHB. Como consecuencia la producción, CO_2 , otro gas de efecto invernadero, se redujo durante la eliminación de CH_4 . Los resultados mostraron evidencia de un efecto positivo sobre la CE y q_{CH_4} debido a la adición de aceite de silicón cuando el sistema permaneció bajo condiciones de crecimiento (Figura 5-2). Se asume que el sistema estaba operando bajo limitación de transferencia de masa, como se puede observar por el hecho de que q_{CH_4} aumentó y también lo hizo la CE. Contrariamente, bajo la condición de limitación de nitrógeno, no hay efecto positivo del aceite de silicón sobre la q_{CH_4} . Este resultado sugiere que bajo limitación de nitrógeno el sistema estuvo controlado por reacción.

La eliminación de CH_4 , tanto para el STR como TPPB, operando bajo limitación de nitrógeno, fue similar y por lo tanto la acumulación de PHB sólo fue ligeramente diferente (Figura 5-6). La limitación por reacción también se puede atribuir a las bajas concentraciones de biomasa presentes en estos experimentos. Es posible que tasas mayores de acumulación de PHB se puedan obtener mediante el aumento de la concentración de biomasa.

5.2 Experimentos con adición de cosustratos

5.2.1 Experimentos en microcosmos bajo condiciones de crecimiento

La Tabla 5-4 resume los resultados cuando citrato, propionato o CH_4 se utilizaron como única fuente de carbono y en mezclas, usando diferentes concentraciones de los mismos y bajo condiciones de crecimiento. *M. organophilum* CZ- 2 mostró $Y_{x,s}$ promedio de 0.84 ± 0.08 y $Y_{\text{CO}_2,s}$ de 0.07 a 0.10, tanto para el citrato y propionato. El consumo de sustrato fue incompleto en ambos casos citrato (72 %) y propionato (78 %) en todas las concentraciones ensayadas, estos resultados se atribuyen a los cambios de pH (alrededor de 8), debido a que al inicio del experimento el pH fue ajustado a 7 utilizando NaOH, subiendo el pH desde 3.5 hasta un pH final de 7, una vez que inicio el consumo de sustrato el pH tendió al cambio alcanzando un pH de 8.

Tabla 5-4. Consumo de CH₄, O₂ y cosustratos, producción de biomasa y CO₂ en matraces cerrados cultivados durante 14 días.

Sustrato (S)	S _{inicial} (g m ⁻³)	S _{consumido} (g m ⁻³)	O ₂ [*] final (g m ⁻³)	CO ₂ , producido (g m ⁻³)	CH ₄ consumido (g m ⁻³)	X _{producido} (g m ⁻³)	Y _{x,s}	Y _{CO₂,s}
Citrato	1000	707±10	111±6	50±1	---	617±10	0.87	0.07
	560	410±5	154±5	30±1	---	343±5	0.84	0.07
	270	191±9	158±3	11±0.2	---	155±2	0.81	0.06
Citrato, CH ₄ ^{**}	320	55±2	110±2	22±0.7	4±0.2	45±1	0.76	0.37
Propionato	403	305±25	120±5	31±3	---	230±10	0.75	0.10
	222	182±15	155±8	18±0.6	---	160±18	0.88	0.10
	148	115±12	150±5	12±0.2	---	107±20	0.93	0.10
Propionato, CH ₄ ^{**}	500	450±4	60±1	100±3	18±0.5	375±	0.80	0.21
CH ₄	87.2	26.16	110±2	20.8	26.16	5.0	0.19	0.80

*21% de oxígeno igual a 180 g m⁻³

**Los rendimientos de sustrato fueron calculados a partir del sustrato total consumido (cosustrato + CH_{4, consumido}), CH₄ en la fase gas de 10% o 49 g m⁻³.

En los experimentos con mezclas de CH₄-cosustrato, los valores de Y_{x,s} fueron similares a los obtenidos cuando se adicionó únicamente el cosustrato, en este caso la presencia de los cosustratos no representó ningún tipo de inhibición al crecimiento ni a la actividad metanotrófica a pesar de la baja solubilidad del CH₄, donde bajo las condiciones ensayadas se tendría una concentración en el líquido de alrededor de 1.5 g m⁻³ (calculada a partir de su coeficiente de partición de 33.5) que es baja comparada con la solubilidad del citrato y propionato (0.43 x 10⁶ g m⁻³ y 1 x 10⁶ g m⁻³, respectivamente). Todo lo anterior, evidencia la capacidad metabólica del microorganismo para utilizar los diferentes sustratos y no perder su habilidad metanotrófica.

Los primeros reportes sobre otras cepas de *M. organophilum* señalaban que perdían fácilmente la capacidad metanotrófica; además los resultados no eran reproducibles y la capacidad para crecer utilizando otros sustratos era variable (Dedysh et al., 2004; Theisen y Murrell, 2005). Ahora *M. organophilum* CZ-2 ha mostrado mayores tasas de eliminación de CH₄ si se compara con el consorcio metanotrófico del que fue aislada; además superó las tasas de consumo de *Methylosinus trichosporium* (Zúñiga et al., 2011).

Con la adición de citrato o propionato el $Y_{x,s}$ es de aproximadamente 0.85, superior a 0.6 que fue el resultado obtenido en el STR y que fue presentado anteriormente. Un rendimiento alto es deseable ya que al alcanzar mayor cantidad de biomasa eventualmente se verá reflejado en mayor acumulación de PHA. Los rendimientos de CO_2 están en el rango de 0.07-0.1 concordando con la cantidad de carbono total consumido, con un efecto favorable al reducir la cantidad de CO_2 liberado a partir de CH_4 .

5.2.2 Experimentos de limitación de nitrógeno en microcosmos

El objetivo de los experimentos de limitación por nitrógeno en microcosmos utilizando mezclas de CH_4 -propionato o CH_4 -citrato fue evaluar la cantidad y el tipo de PHA producidos. En la Figura 5-7 se muestra el contenido de biomasa activa y la concentración de PHA y el porcentaje que representa. Después de 23 días, el contenido de biomasa activa fue de 95 y 220 g m^{-3} para la mezcla CH_4 -propionato y propionato solo, respectivamente; y de 75 y 190 g m^{-3} para los experimentos de citrato en mezcla y en presencia del cosustrato (Figura 5-7).

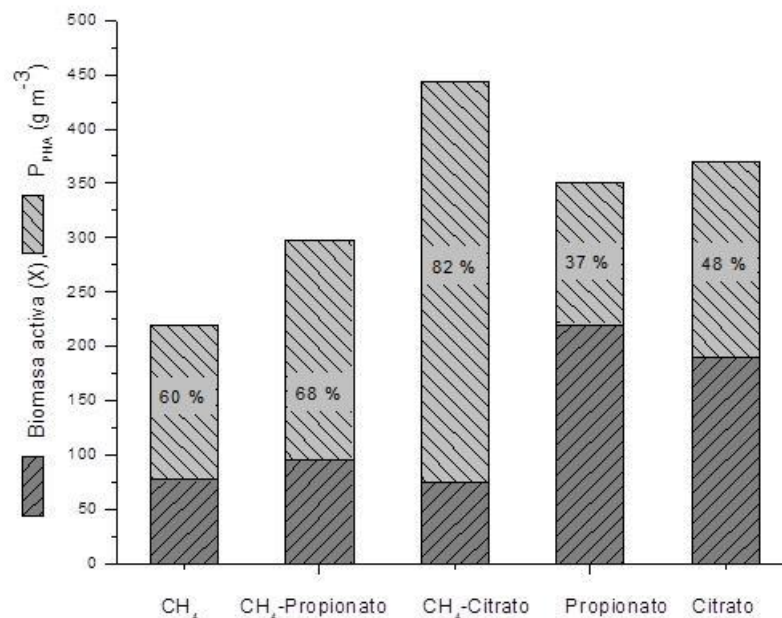


Figura 5-7. Experimentos en microcosmos limitados por nitrógeno, $X_T = X + \text{PHA}$

El contenido de PHA más bajo, 143 g m^{-3} , se obtuvo en el control con CH_4 solo (y_{PHA} de 0.60 con una composición HB:HV:HO en una relación molar 95:5:0), contenido similar al 0.57 alcanzado durante los experimentos anteriores donde solo se cuantificó el PHB. La acumulación de PHA más alta se observó en el experimento CH_4 -citrato siendo de 369 g m^{-3} equivalente a un y_{PHA} de 0.82 con una relación HB:HV:HO de 86:14:0, en el ensayo de CH_4 -propionato se alcanzó un valor de 200 g m^{-3} con un y_{PHA} de 0.68 y razones de HB:HV:HO de 70:30:0.

Los controles de propionato y citrato alcanzaron un contenido de PHA de 130 g m^{-3} (y_{PHA} de 0.37, con relación HB:HV:HO de 37:56:7) y 180 g m^{-3} , (y_{PHA} de 0.48, con proporción HB:HV:HO de 35:53:12), respectivamente. En general, la presencia de CH_4 favorece la acumulación de HB cuando se utiliza como única fuente de carbono; y el HV es el principal alcanato cuando se adicionan propionato o citrato, en algunos casos también se detecta acumulación de HO.

Las pruebas de CH_4 -cosustrato muestran un aumento en HV, con respecto a CH_4 solo. Esta es la primera vez que se utiliza CH_4 y algunos cosustratos para producir copolímeros de PHA.

En el caso del propionato se esperaba que la producción de hidroxivalerato aumentara ya que a partir de este co-sustrato se sintetiza propionil-CoA, que combinado con acetil-CoA, produce hidroxivaleril-CoA que es el precursor del HV. Aunque la producción de HV es la principal vía para la transformación propionato es posible la formación de hidroxibutiril-CoA, el precursor de las unidades de HB, que proviene de la condensación de dos unidades de acetil-CoA, ya que HB es el monómero típico durante la degradación de CH_4 . Por otra parte, el citrato promueve la acumulación de acetil-CoA, que es un precursor de la producción de PHB; la siguiente reacción lleva a cabo la síntesis de acetoacetil-CoA y la constante de equilibrio de esta reacción no es favorable hacia la síntesis de acetoacetil-CoA de modo que son necesarias altas concentraciones de NADH y acetil-CoA y bajas concentraciones de CoA, desplazando el equilibrio en favor de la biosíntesis de PHA, donde la síntesis de HB o HV dependen de las velocidades de reacción que se producen después de malyl-CoA ligasa (Gandini y Belgacem, 2008).

La presencia de citrato durante la biotransformación está directamente relacionada con la conversión a succinil-CoA y malato, todos presentes en el ciclo del TCA; que puede promover la presencia de malyl-CoA reductasa que a través de la enzima malyl-CoA ligasa puede generar tanto la acetil-CoA como propionil-CoA reductasa, que eventualmente se convertirá en PHA.

Otras cepas metanotróficas que llegaron a acumular 12 % de PHB aumentaron su acumulación a 40 % en presencia de citrato (Zhang et al., 2008). Además, algunas cepas *Methylobacterium*, como AM1, ZP24 o *Methylobacterium extorquens*, consumen el ácido acético o el suero de queso, pero HB es el único monómero detectado y la producción en los reactores no ha sido reportada (Nath et al., 2008). También se ha reportado que cuando se agrega propionato en lodos activados, las proporciones de PHB-V son de 76:24, sin embargo el contenido de PHA es bajo (12 % g g⁻¹) (Jiang et al., 2011). Por otro lado, Kim et al. (1999) reportaron que *M. organophilum* NCIB 11278 alcanzó un contenido de PHA de 41 % w w⁻¹ con 14 % de HV cuando se alimentó con metanol y ácido valérico.

5.2.3 Experimentos en bioreactores utilizando citrato y propionato como cosustratos

Las Figuras 5-8 y 5-9 muestran la capacidad de eliminación de CH₄, la tasa de producción de CO₂, el NO₃⁻ consumido y el rendimiento alcanzado durante la biotransformación de citrato o propionato.

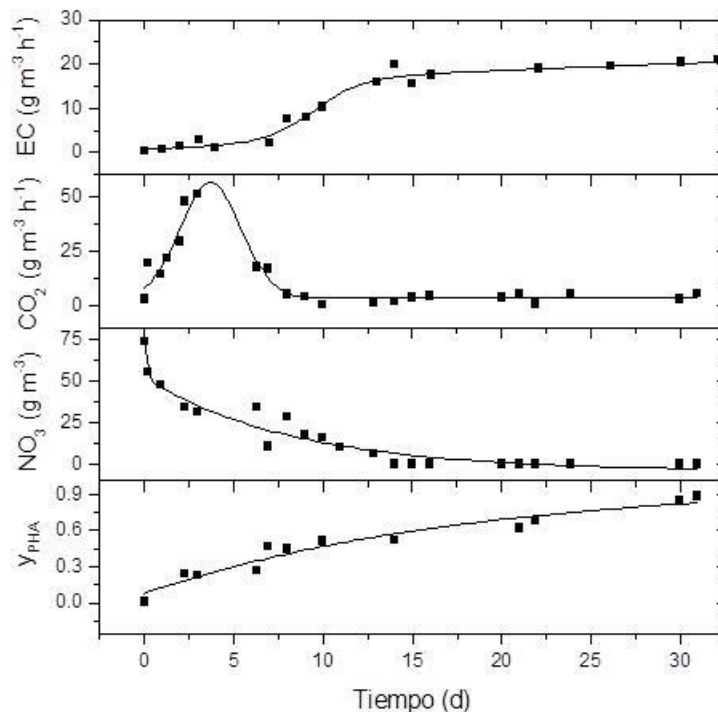


Figura 5-8. Capacidad de eliminación, CO₂ producido, NO₃⁻ consumido y Y_{PHA} alcanzado durante el experimento CH₄-citrato.

En el caso de experimento CH₄-citrato (Figura 5-8), la CE aumentó de forma lineal hasta 20 g m⁻³ h⁻¹ en 30 días, lo que representa una q_{CH₄} de 90 mg_{CH₄} g_x⁻¹ h⁻¹, la q_{CO₂} alcanzó un máximo de 55 g m⁻³ h⁻¹ relacionado durante los primeros 5 días con el consumo de citrato, hasta alcanzar un valor estable de 8 g m⁻³ h⁻¹, el cual está dentro de los valores reportados (Nikiema et al., 2007). La asimilación de nitrógeno favorece un ambiente limitado en este elemento, promoviendo la acumulación de PHA alcanzando 140 g m⁻³ (y_{PHA} 0.88 g g⁻¹). Aproximadamente, el 95 % del nitrógeno consumido se encontró en la biomasa producida, cerrando un balance según la biomasa producida determinada por el método de Lowry, respecto al nitrógeno total consumido.

Los rendimientos y las tasas específicas se calcularon con los datos presentados en la Figura 5-8, durante los primeros 10 días de biotransformación, el valor integrado de CO₂ duplicó el valor de la CE debido al consumo de citrato. En este caso, la acumulación de PHA fue de hasta 88 % w⁻¹, este valor es el más alto reportado para cualquier metanótrofo (Kim et al., 1999).

Por otro lado, cuando se adicionó propionato, la degradación de CH₄ fue muy baja en el arranque del experimento (Figura 5-9). Después de 10 días, la CE alcanzada fue de 8 g m⁻³ h⁻¹. Inicialmente, la q_{CH₄} alcanzó un valor de 20 mg_{CH₄} g_x⁻¹ h⁻¹, aumentando continuamente hasta 50 mg_{CH₄} g_x⁻¹ h⁻¹ hasta el final del experimento; en este ensayo sólo se consumió el 25 % del CH₄ alimentado, que es menor del 45 % alcanzado cuando el CH₄ fue el único sustrato. Tanto la q_{CH₄} como la CE disminuyeron alrededor de un 50 % en comparación con los 15 g m⁻³ h⁻¹ y 100 mg_{CH₄} g_x⁻¹ h⁻¹ que se obtuvieron cuando el CH₄ fue la única fuente de carbono, aunado a esto la acumulación de PHA fue de 0.3. La evolución de q_{CO₂} fue similar en el experimento de citrato, donde aumentó hasta 7 g m⁻³ h⁻¹ con un valor en estado estacionario de 1.5 g m⁻³ h⁻¹. Después de 20 días se agotó el nitrógeno y en 35 días el contenido de PHA fue de 0.3 que corresponde a una concentración de 50 g m⁻³.

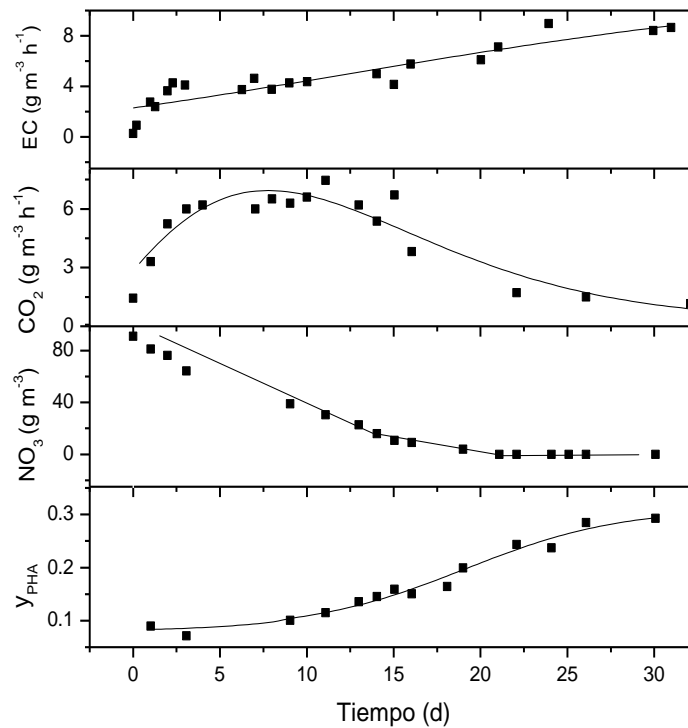


Figura 5-9. Capacidad de eliminación, CO₂ producido, NO₃ consumido y y_{PHA} alcanzado durante el experimento CH₄-propionato.

Al final de ambos experimentos se determinó el tipo de PHA producidos, en el caso del ensayo con CH₄-citrato los PHA acumulados fueron HB:HV:HO en proporción 55:35:10, y para el experimento CH₄-propionato los polímeros fueron HB:HV en relación 75:25. La cristalinidad y biodegradabilidad de PHB se pueden mejorar con la presencia de otros hidroxialcanoatos, principalmente HV. En este trabajo, con ambos experimentos por lotes en biorreactor se alcanzó alto contenido de HV (entre 25-55% g g⁻¹). La temperatura de fusión (T_m) disminuye en función del contenido de HV. Algunos trabajos reportaron que la T_m se redujo desde 450 hasta 354 K para polímeros que contienen 0 y el 71 % de HV, respectivamente (Gandini y Belgacem, 2008; Chanprateep, 2010). Por ejemplo en los resultados para determinar el porcentaje de alargamiento antes de rompimiento del PHB y una mezcla PHB-HV (20:80), los valores fueron de 5 y 100, respectivamente; mostrando que la presencia de HV aumenta 20 veces el alargamiento, denotando que un polímero con un número variado de monómeros (HV, HO, HHep, etc) aumenta varias de veces su elasticidad (Flickinger y Drew, 1999; Gandini y Belgacem, 2008).

5.2.4 Caracterización estructural de los PHA por RMN y calorimetría

A través de los estudios de RMN se elucidó la presencia de otros monómeros de PHA y sus isómeros, los cuales tienen gran influencia sobre las propiedades de los polímeros.

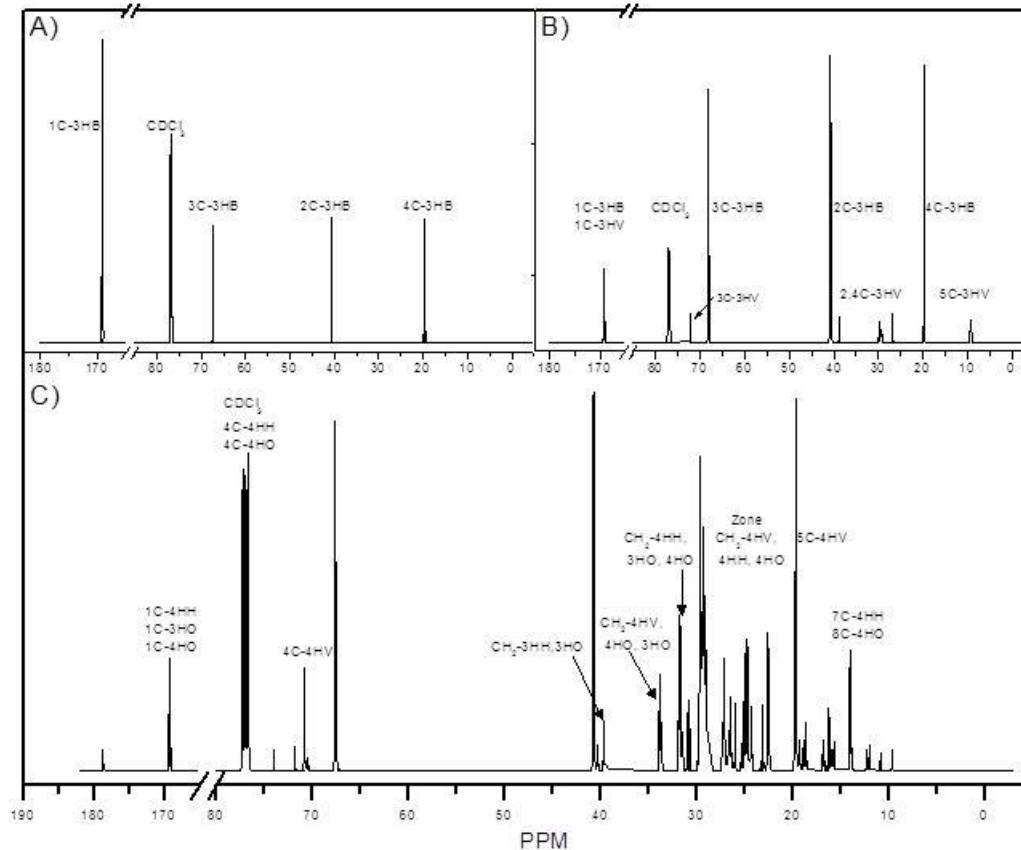


Figura 5-10. Caracterización del PHA producido con diferentes sustratos mediante RMN, A) CH_4 , B) CH_4 -propionato y C) CH_4 -citrato.

Los resultados mostraron (Figura 5-10) que cuando CH_4 se alimentó como la única fuente de carbono, el polímero acumulado se compone principalmente de 3-hidroxi butirato (3HB). En el caso del experimento de CH_4 -propionato se acumuló un copolímero que incluía 3HB y 3-hidroxi valerato (3HV), y finalmente en el caso de CH_4 -citrato, se detectó la presencia de 3HB, 3HV, 4-hidroxi valerato (4HV), 4-hidroxi heptanoato (4HH), 3 y 4-hidroxi octanoato (3HO, 4HO).

RMN mostró la presencia de un nuevo monómero identificado tentativamente como 4HH. Sin embargo, 4HH no se detectó en el análisis cromatografía de gas, posiblemente debido a que su concentración estaba por debajo del límite de detección.

Los resultados son alentadores ya que podrían mejorar las propiedades físicas y mecánicas de los polímeros comparados con los que tienen mezclas simples de 3HB y 3HV que son similares a lo reportado para organismos metanotróficos, en concreto, los polímeros que contienen HV se han reportado como difícil de obtener en grandes cantidades. Es necesario un estudio detallado del metabolismo y las capacidades de *Methylobacterium organophilum* CZ-2.

En la Tabla 5-5 se muestran los resultados obtenidos en el calorímetro, los cuales son concordantes con lo reportado en la bibliografía, durante este análisis se determinó la T_m de diferentes estándares con la finalidad de comparar la reproducibilidad del equipo con los reportes encontrados en la bibliografía. Los resultados muestran que el valor más alto de T_m lo tiene un polímero estándar de PHB puro con un valor de 173 °C aproximadamente; a medida que el polímero analizado tiene mayor cantidad de otros copolímeros este valor tiende a disminuir, así que está relacionado con el porcentaje de elongación del polímero, por ejemplo para un polímero puro de PHB el porcentaje de elongación es de 5 % aproximadamente, en el caso de una mezcla de copolímeros PHB-V 80:20, la T_m es de 145 °C y esto corresponde a un porcentaje de elongación del 50 %, pero para un polímero modelo con composición HB-HV-4HV-3Hep-HO 20:47:16:15:2, con una T_m de 120 el porcentaje de elongación es de 850 %, lo cual le da mayor calidad al polímero, superando una de las principales desventajas de la síntesis de un homopolímero de PHB, de esta forma los polímeros sintetizados utilizando cosustratos poseen mejores propiedades plásticas, dando ventajas a *Methylobacterium organophilum* CZ-2, por su capacidad de sintetizar este tipo de polímeros sin ningún tipo de modificación genética, únicamente a través de una selección racional de cosustratos.

Tabla 5-5. Resultados obtenidos en el calorímetro.

Polímero	T_m (°C)	ΔH (J g ⁻¹)	Referencia
STD PHB, 100	173±0.5	90.2±3	Este estudio
STD PHB, 100	170±1	84.7±2	Lopez-Cuellar et al., 2011
STD PHB-V, 88:12	154±1	57.3±6	Este estudio

STD PHB-V, 80:20	145		Gandini y Belgacen, 2008
CH ₄ PHB-V, 95:5	165±1	48.8±4	Este estudio
Propionato-CH ₄ , PHB-V-O, 75:25	148±2	41.5±1	Este estudio
Citrato-CH ₄ , PHB-V-O, 65:34:11	118	29	Este estudio

5.3 Modelo metabólico a escala del genoma de *Methylobacterium organophilum* CZ-2.

5.3.1 Reconstrucción del modelo

La ruta metabólica de *Methylobacterium organophilum* CZ-2 se construyó manualmente y fue validada como se describe en la sección de materiales y métodos.

El modelo incluye 128 reacciones con 119 metabolitos, 19 reacciones de transporte y 18 metabolitos externos, toda la reconstrucción se basó en gen-proteína-reacción (GPR) asociando todas las reacciones de la ruta de este modo (ver ANEXO 1 y 2); las reacciones incluidas en el modelo consideran el estado de la célula bajo limitación por nitrógeno, de esta manera, las reacciones de crecimiento celular se excluyeron.

Las principales rutas del modelo son: la mineralización de CH₄, ciclo de Serina, ciclo de los ácidos tricarboxílicos, la fosforilación oxidativa, la ruta del etilmalonilo-CoA, la síntesis de PHA, la degradación de PHA, consumo de 7 cosustratos (Figura 5-11).

La capacidad de los metilótrofos para consumir metanol como única fuente de carbono y energía se basa en rutas desasimiladoras y de asimilación, que cumplen todos los requerimientos energéticos y de cofactores biosintéticos necesarios. La reconstrucción de la red metabólica de *M. extorquens* fue realizada por Peyraud et al., (2011) que se basó en el estudio de este tipo de rutas y su fragilidad.

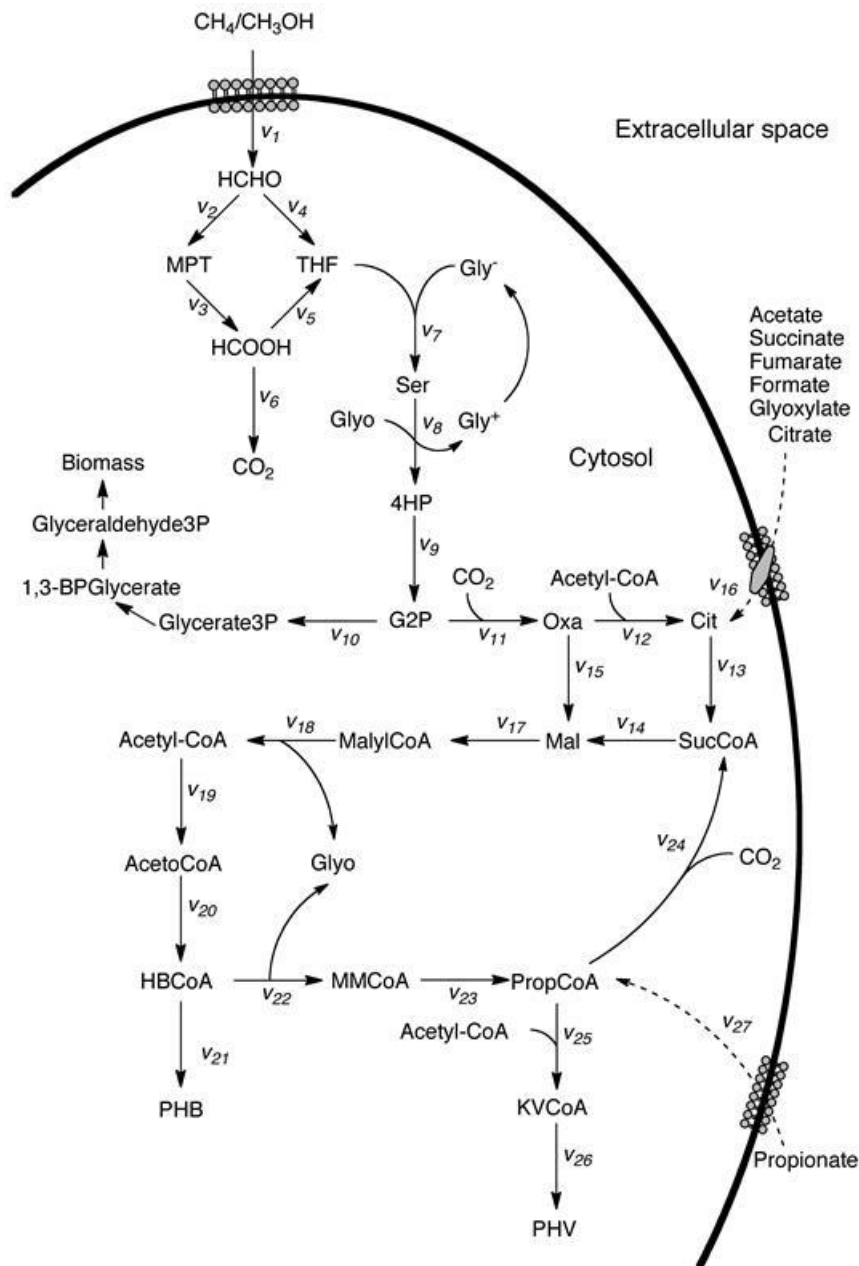


Figura 5-11. Ruta de degradación de CH_4 y cosustratos probados *in silico*.

La síntesis biológica de polihidroxicanoatos a partir de metanol se ha estudiado en diferentes procesos por lotes o lote alimentado usando cosustratos solubles, pero nunca a partir de CH_4 con la cepa *Methylobacterium organophilum* CZ-2.

El PHA es un producto de valor agregado que se acumula cuando las células se encuentran en medio líquido bajo la condición de ausencia de nitrógeno principalmente. La limitación por nitrógeno tiene un impacto directo en la síntesis de proteínas, por lo que la concentración de proteína se mantiene constante y la síntesis

de PHA se activa como un mecanismo de defensa acumulando materiales de reserva con una composición elemental mayormente de $C_4H_6O_2$ (PHB).

La principal ruta de desasimilación se sabe que es la oxidación de CH_4 a CO_2 , este proceso implica el transporte de CH_4 al interior de la célula y posteriormente la oxidación en el espacio periplásmico a metanol y luego de metanol a formaldehído, ya que la síntesis de CO_2 se lleva a cabo en el citoplasma, así que los compartimentos considerados en el modelo son: compartimento externo, periplasma y citoplasma; aunque la mayoría de las reacciones se llevan a cabo en el citoplasma; en el modelo se considera que el PHA es un metabolito extracelular, esta consideración se realiza con el fin de satisfacer los balances el FBA, es importante aclarar que el PHA fisiológicamente es un polímero intracelular y para recuperarlo se requiere de diferentes procesos de extracción, donde se debe lisar a la célula; posteriormente se llevan a cabo la solubilización del polímero en cloroformo y finalmente purificación en hexano.

5.3.2 Análisis de Shadow prices

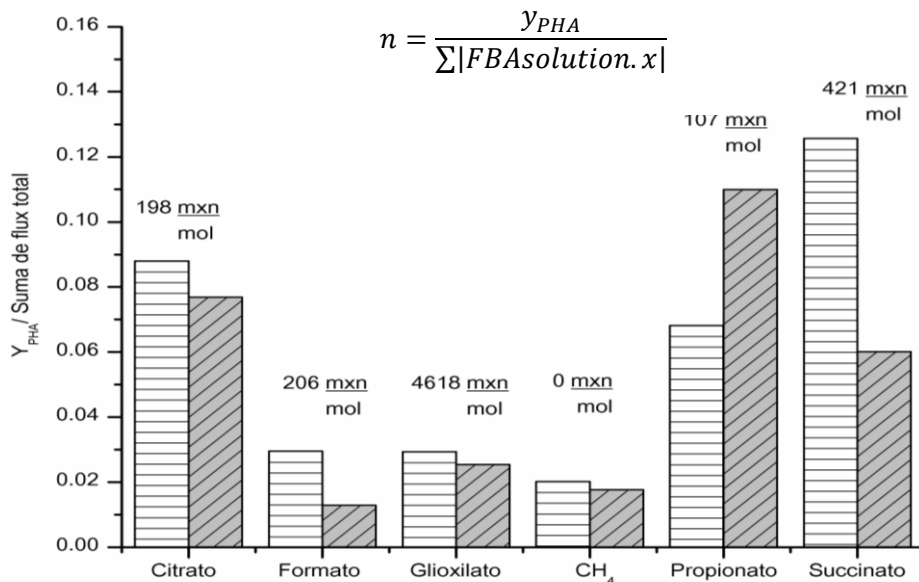
Con la reconstrucción del modelo finalizada, se calcularon los rendimientos estequiométricos con los diferentes cosustratos: citrato, propionato, acetato, succinato, fumarato, formato y glioxilato, en cada simulación se utilizó un mol de cada sustrato, posteriormente se realizaron simulaciones *in silico* de mezclas de un mol de cosustrato y un mol de CH_4 .

Al tiempo que se calcularon los rendimientos, también se obtuvieron diferentes vectores que expresaron los valores de los Shadow prices (FBA solution.y), todos los rendimientos aumentaron cuando los cosustratos se combinaron con CH_4 , así que se calculó una relación entre el rendimiento de PHB obtenido de la mezcla de CH_4 -cosustrato, respecto a la suma de los rendimientos obtenidos independientemente de CH_4 y de cada cosustrato (Tabla 5-5). Se observó que los cosustratos de menor efecto sobre la función objetivo respecto a la mezcla de CH_4 -cosustrato son acetato y fumarato (↓), mientras los que tienen un efecto medio son citrato, formato y succinato, dos de estos intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (→), otros con mayor efecto son glioxilato y propionato (↑). Por lo tanto el acetato y el fumarato se pueden descartar después del análisis de shadow prices; se calculó η que es el rendimiento de PHA para cada cosustrato dividido entre el absoluto de la sumatoria del vector de flujos (FBA solution.x), este vector muestra el flujo en cada reacción, en ocasiones no todas las reacciones presentes en el modelo son utilizadas; por ejemplo, cuando se

sintetiza un polímero compuesto únicamente de HB las reacciones involucradas en la síntesis de otros monómeros tienen un flujo de 0. Así que otra estrategia para determinar que cosustratos son factibles metabólicamente se representa a través del cálculo de esta relación (η). En este caso se incluyeron diferentes análisis *in silico* de la síntesis de PHB y un copolímero de PHB-V-O (78:13:9), los resultados se muestran en la Figura 5-12.

Tabla 5-6. Rendimiento de cada cosustrato y en mezcla con CH₄.

Cosustrato	$Y_{PHB, \text{cosustrato}}$	$Y_{PHB, CH_4-\text{cosustrato}}$	$Y_{CH_4-\text{cosustrato}}^- (Y_{CH_4} + Y_{\text{cosustrato}})$
Acetato	0.439	0.667	↓0.005
Citrato	0.970	1.213	→0.021
Formato	0.089	0.333	→0.022
Fumarato	0.657	0.889	↓0.010
Glioxilato	0.177	0.444	↑0.046
Propionato	0.750	1.000	↑0.028
Succinato	0.756	1.000	→0.022
CH ₄	0.222	0.222	0.000



*Los precios fueron consultados en Noviembre del 2013 y corresponden al precio de cotizar presentaciones por 1 kg, 5 kg y 10 kg.

Figura 5-12. Rendimientos respecto al flujo total de cada cosustrato (η), análisis de precios, síntesis de PHB (líneas horizontales), PHB-V-O (78:13-9) (líneas diagonales).

Los cosustratos que son factibles metabólicamente incluyen entonces al citrato, propionato y succinato según los rendimientos que alcanzan con cada cosustrato respecto a la suma total de flujo en todas las reacciones que se utilizan. El análisis de precios se realizó con base en los costos de Sigma, Formedium y Fisher; mostrando que los cosustratos más competitivos según su precio son: citrato a \$198.00 mxn por mol y propionato a \$107.00 mxn mol⁻¹, mientras que el succinato tiene un costo de \$421.00 mxn mol⁻¹, siendo el cosustrato más caro con un costo de más del doble comparado con los otros cosustratos.

En este análisis se observa que, tanto el citrato como el succinato son cosustratos apropiados si la función objetivo es la síntesis de un homopolímero de PHB, en el caso del succinato se alcanza un valor mayor a 0.12, mientras que para el citrato el valor está en 0.085 aproximadamente, estos valores son mayores respecto al del propionato de 0.07, cabe mencionar que la síntesis un homopolímero de PHB no es recomendable por la fragilidad de plástica que presenta.

En el caso de la síntesis del copolímero PHB-V-O (78:13:9) alcanzó valores de η de 0.06, 0.077 y 0.11 para succinato, citrato y propionato, respectivamente: el valor menor implica que para la célula el requerimiento de flujos o reacciones activas para alcanzar cierto rendimiento es mayor así que los dos últimos valores son adecuados/mejores.

Este análisis proporciona suficiente evidencia metabólica y de costos para descartar al succinato ya que presenta mayor capacidad de producir PHB respecto a la cantidad de copolímero, además de un costo mayor. En la siguiente sección se presentan diferentes análisis energéticos y termodinámicos utilizando, citrato y propionato.

5.3.3 Análisis energético y termodinámico

El análisis energético se basa en el hecho de que el microorganismo es capaz de almacenar PHA como fuente de reserva energética, así que se plantea describir la cantidad de energía (ATP) que se almacena como PHA por cada mol de sustrato que se alimenta, una representación gráfica de este proceso se muestra en la Figura 5-13.

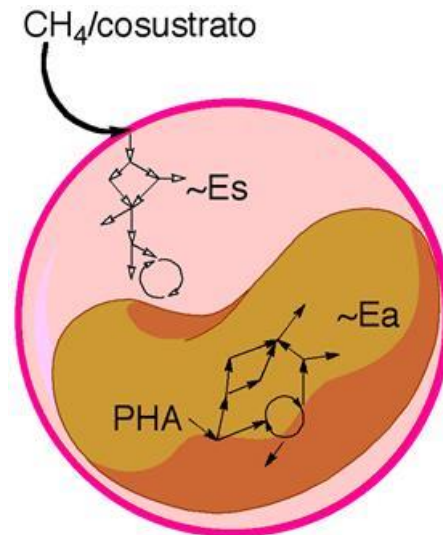


Figura 5-13. Almacenamiento de PHA por *M. organophilum* CZ-2.

Como se puede observar cualquier sustrato alimentado a la célula durante la fase de ausencia de nitrógeno, será metabolizado a PHA. La *Es* representa la cantidad de energía en forma de ATP que se obtiene directamente del metabolismo de un mol de CH_4 o cosustrato, La *Ea* equivale a la energía almacenada en forma de PHA, en este caso PHA es un polímero que contiene monómeros de HB, HV, HO.

La Tabla 5-6 muestra la cantidad de ATP que es posible obtener a partir de CH_4 , cosustratos y PHA, la cantidad de energía almacenada está relacionada con el tamaño de las moléculas en el caso de los sustratos; el modelo es capaz de consumir cualquiera de los sustratos presentados.

Tabla 5-7. Cantidad de ATP producido por cada mol y gramo de sustrato (*Es*) y monómeros de polímero.

Sustrato	ATP (<i>Es</i>)	ATP ($\text{mol}_{\text{ATP}} \text{g}_S^{-1}$)
CH_4	6.5	0.406
Citrato	17.75	0.092
Propionato	13.25	0.138
HB	16	0.193
HV	23.25	0.233
HO	34.25	0.241

Para realizar este análisis se redefinieron algunos límites en el modelo para HB, HV, HO ($-\infty \leq HB_{\text{consumido}} \leq 0$, $-\infty \leq HV_{\text{consumido}} \leq 0$, $-\infty \leq HO_{\text{consumido}} \leq 0$), este límite está en función de la cantidad de sustrato que se alimenta y la solución objetivo que se obtenga bajo estas condiciones, en la Tabla 5-7 se muestran los resultados obtenidos con los diferentes sustratos y composiciones de polímero estudiadas.

En la tercer columna se muestra la cantidad de polímero que se obtiene con el sustrato (segunda columna), posteriormente este valor es el límite para la siguiente simulación y se obtiene la cantidad de ATP almacenado como PHA, finalmente se calcula la fracción Ea/Es utilizando los valores de la Tabla 5-6.

De acuerdo con el análisis de los flujos metabólicos cuando la función objetivo es la descomposición de ATP, se demostró que la cepa es capaz de almacenar más energía cuando hay acumulación de copolímeros, sin importar el sustrato que se adicione.

Tabla 5-8. Energía almacenada en forma de polímeros, relación energía almacenada (Ea), energía del sustrato (Es).

Composición del polímero	CH ₄ (mol)	Polímero	ATP (Ea)	Ea/Es
3HB (100)	1	0.222	3.552	0.546
3HB-HV-HO (78:13:9)	1	0.194	3.613	0.556
Citrato (mol)				
3HB (100)	1	0.970	15.520	0.874
3HB-HV-HO (78:13:9)	1	0.847	15.742	0.887
Propionato (mol)				
3HB (100)	1	0.750	12.000	0.906
3HB-HV-HO (78:13:9)	1	0.662	12.298	0.928

A continuación se calculó el ΔG_r° para la reacción de síntesis de PHB y el copolímero que se muestra en la Tabla 5-8, el análisis termodinámico se realizó según lo descrito en la sección de materiales y métodos, los resultados con CH₄ muestran que los valores de ΔG_r° para la síntesis de PHB o PHA son muy parecidos, razón que podría explicar que durante el consumo de CH₄ el polímero producido es una cadena muy cercana a un homopolímero de PHB (95 %), ya que la disipación de energía es similar y la célula tiende a almacenar la molécula más sencilla o fácil de sintetizar.

El ΔG_r° del citrato es menor cuando se produce un copolímero, lo que teóricamente respalda el hecho que el citrato podría funcionar como un buen cosustrato ya que tiene una menor disipación de energía durante la síntesis de PHA ($\Delta G_r^\circ = -191.38$ KJ

mol⁻¹), comparándolo con la síntesis de PHB (-241.36KJ mol⁻¹), en el caso del propionato la diferencia entre ΔG_r° para PHB y PHA es mayor lo que implicaría mucho menor disipación de energía al acumular PHA utilizando este cosustrato; la reacción global de este proceso es la menor de todos los casos.

Tabla 5-9. ΔG_r° (KJ mol⁻¹) de las reacciones de síntesis de PHB y PHA.

Sustrato	3HB (100)	3HB-HV-HO (78:13:9)
CH ₄	-363.90	-363.20
Citrato	-241.36	-191.38
Propionato	-107.18	-25.60

Tabla 5-10. Experimentos realizados para validar el modelo.

A)	CH ₄		CO ₂		Propionato		Citrato		PHA		Y _{PHA,S}		
	Sustrato	g m ⁻³	mol m ⁻³	g m ⁻³	mol m ⁻³	g m ⁻³	mol m ⁻³	g m ⁻³	mol m ⁻³	g m ⁻³	mol m ⁻³	mol mol ⁻¹	
CH ₄	25.000	1.563	3.310	0.075	---	---	---	---	46.900	0.541	0.35		
CH ₄ - citrato	10.190	0.637	17.500	0.398	---	---	155.540	0.810	108.000	1.119	0.77		
CH ₄ -prop	11.960	0.748	11.000	0.250	36.000	0.375	---	---	40.000	0.443	0.40		
Citrato	---	---	15.000	0.341	---	---	280.000	1.458	145.000	1.460	1.00		
Propionato	---	---	32.330	0.735	158.110	1.318	---	---	68.240	0.694	0.53		
B)	CH ₄		CO ₂		Propionato		Citrato		PHA		Y _{PHA,S}	Y _{CO₂,S}	Y _{PHA,X}
Sustrato	g g _x ⁻¹ m ⁻³	mol m ⁻³	g g _x ⁻¹ m ⁻³	mol m ⁻³	g g _x ⁻¹ m ⁻³	mol m ⁻³	g g _x ⁻¹ m ⁻³	mol m ⁻³	g g _x ⁻¹ m ⁻³	mol m ⁻³	mol mol ⁻¹	mol mol ⁻¹	g g ⁻¹
CH ₄	0.2083	0.0130	0.0276	0.0006	---	---	---	---	0.3908	0.0045	0.35	0.05	0.60
CH ₄ - citrato	0.0637	0.0040	0.1094	0.0025	---	---	0.9721	0.0051	0.6750	0.0070	0.77	0.27	0.82
CH ₄ -prop	0.0629	0.0039	0.0579	0.0013	0.1895	0.0020	---	---	0.2105	0.0023	0.40	0.22	0.68
Citrato	---	---	0.0789	0.0018	---	---	1.4737	0.0077	0.7632	0.0077	1.00	0.23	0.49
Propionato	---	---	0.1540	0.0035	0.7529	0.0063	---	---	0.3250	0.0033	0.53	0.56	0.39

En la Tabla 5-9 se muestran las condiciones y resultados de los experimentos planeados para validar el modelo. Se realizaron experimentos control donde sólo se adicionó CH₄, citrato ó propionato, y también se realizaron experimentos en mezcla de CH₄-citrato y CH₄-propionato. Los resultados presentados corresponden a la integración de los datos cuando se alcanza el estado estacionario en el sustrato(s) consumido(s) y el CO₂ producido.

La Tabla muestra las concentraciones de citrato y propionato consumidos. Adicionalmente se presentan las concentraciones normalizadas por la cantidad de biomasa en cada experimento. Cabe mencionar que la biomasa residual o biomasa activa fue monitoreada a lo largo del experimento por el método de Lowry y no cambia su concentración. También se calcularon los rendimientos de PHA respecto a la biomasa ($Y_{PHA,x}$). Como se puede apreciar se acumuló una mayor cantidad de PHA respecto a la biomasa total en el caso de la mezcla de sustratos CH₄-citrato alcanzando una acumulación de 82 %, seguido de la acumulación obtenida con la mezcla CH₄-propionato donde se alcanzó 68 %, valor similar al obtenido cuando el CH₄ es la única fuente de carbono.

En el caso de los rendimientos de PHA respecto a la cantidad de sustrato consumido se observó un efecto positivo de la presencia de citrato, ya sea adicionado como única fuente de carbono o en mezcla con CH₄, los valores alcanzados son 1 y 0.77 para citrato y CH₄-citrato respectivamente, estos valores son mayores a los obtenidos cuando el propionato fue adicionado, se obtuvieron valores de 0.53 y 0.4 para los experimentos propionato y CH₄-propionato respectivamente, finalmente el valor mas bajo fue para el CH₄ alcanzando un valor de 0.35. Cabe señalar que cuando los cosustratos fueron adicionados como única fuente de carbono los rendimientos de PHA fueron mayores. Es importante mencionar que la adición de los cosustratos se realizó como un pulso al inicio del experimento.

5.3.4 Comparación de las predicciones *in silico* con los resultados experimentales.

El modelo fue utilizado como marco para analizar posibles candidatos de cosustratos para *M. organophilum* CZ-2, utilizando MSM. La ruta se obtuvo a través de la asociación con los genes presentes en el genoma de *Methylobacterium* ya que la información del genoma completo de *M. organophilum* CZ-2 no está disponible ya que es un organismo recientemente aislado e identificado; la función de optimización fue la

síntesis de polímeros o copolímeros de PHA. Se compararon las predicciones *in silico* con datos experimentales para evaluar el potencial predictivo del modelo (Tabla 5-9).

La Tabla 5-10 muestra los resultados obtenidos para diferentes composiciones de polímero, desde un homopolímero de PHB hasta copolímeros con unidades monoméricas de HB, HV, HO, cabe mencionar que los experimentos con cosustratos se realizaron como se describió en la metodología, adicionando un pulso inicial de cosustrato.

Tabla 5-11. Validación del modelo.

Composición del polímero	Sustrato	$Y_{PHA, sustrato}$	
		Experimental	Teórico
PHB	CH ₄	0.346	0.347
PHB-V(85:15)	CH ₄ -Citrato	0.773	0.897
PHB-V(70:30)	CH ₄ -propionato	0.395	0.416
PHB-V-O (42:48:10)	Propionato	0.527	0.785
PHB-V-O (35:55:10)	Citrato	1.001	1.070

Los resultados experimentales son similares a los predichos por el modelo, lo que nos da evidencia suficiente para decir que el modelo reproduce el comportamiento de la bacteria según la adición de cada cosustrato, todos los experimentos fueron realizados bajo limitación de nitrógeno. Se han realizado algunos GEMM para la acumulación de PHA, pero solamente se presentan datos *in silico* de las posibles propiedades de los polímeros sintetizados por los organismos como *E. coli*, *Pseudomonas putida* KT2440, sin presentar evidencia suficiente de la comparación entre los datos *in silico* con resultados experimentales (Nogales et al., 2008).

5.3.5 Análisis del plano de fase del consumo de CH₄ y citrato.

Después de la selección de cosustratos, se hicieron una serie de experimentos donde se evaluó el efecto de la adición de citrato y propionato sobre el consumo de CH₄ y la acumulación de PHA; tanto el citrato como propionato obtuvieron buenos resultados en cuanto a la composición del polímero, como se muestra en la Tabla 5-10, la diferencia fue que la cepa alcanza un contenido de PHA mayor utilizando citrato (82 %), así que se realizaron planos de fases para estudiar el efecto de este cosustrato, las condiciones estudiadas que se utilizan como límites para el modelo se

muestran en la Tabla 5-9. Se ejecutó el análisis del plano de fase para elucidar la correlación entre el consumo de CH_4 y el consumo de citrato sobre la producción de PHB y PHB-V-O (78:13:9), La Figura 5-14 se generó con una maya de 10000 simulaciones de diferentes tasas de consumo de CH_4 y citrato, dentro de las cuales se incluyeron los valores experimentales de la Tabla 5-9, y fueron comparados con los resultados de la Tabla 5-10, donde se observó que los resultados experimentales para el caso de la síntesis de PHA se encuentran cerca del óptimo para el caso de CH_4 y CH_4 -citrato, mientras que para los experimentos con citrato los rendimientos alcanzados experimentalmente están más alejados de los predichos por el modelo, se construyeron planos de fases con la relación η , tratando de localizar la línea óptima, ya que los planos de fases con la solución a la función objetivo no se encontró, esto nos puede ayudar a encontrar las concentraciones óptimas de cosustratos para la acumulación de cierto polímero, pero en general al analizar los resultados no se observó una línea de optimalidad solamente que a mayor cantidad de sustratos, mayor rendimiento de polímero.

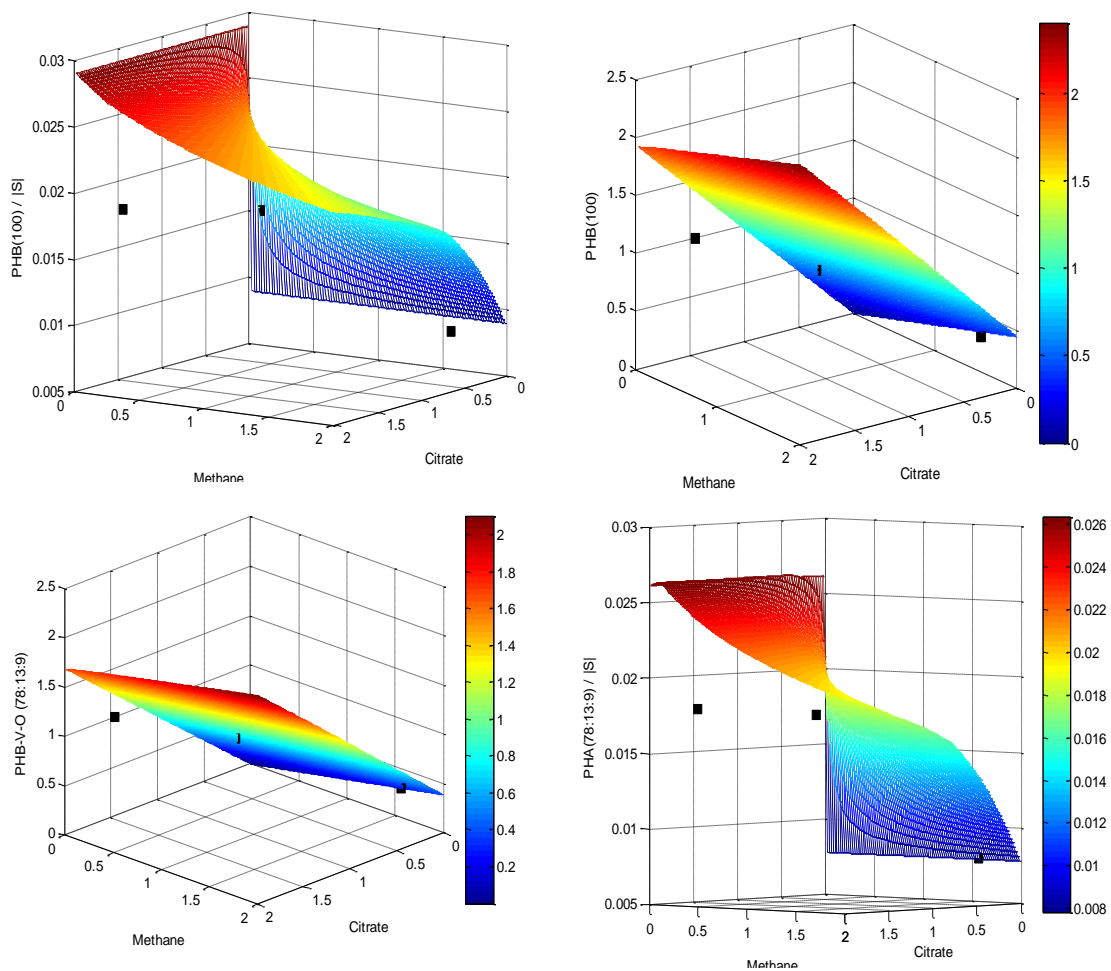


Figura 5-14. Planos de fases de consumo de CH_4 y citrato.

6. CONCLUSIONES

6.1 Conclusión general

El estudio desarrollado en esta tesis permitió hacer un análisis de la biotransformación de CH₄ en PHA; durante este trabajo se aisló una nueva especie metanotrófica, *Methylobacterium organophilum* CZ-2, que fue estudiada bajo diferentes condiciones de cultivo en vista de incrementar su capacidad degradadora de CH₄ y optimizar la producción de PHA utilizando diferentes cosustratos, los cuales fueron seleccionados de manera racional a través de un modelo metabólico.

En general los objetivos planteados al inicio de este proyecto se cumplieron satisfactoriamente, ahora el tratamiento de corrientes contaminadas con CH₄ en bajas concentraciones se puede realizar con un microorganismo novedoso, el cual tiene altas potencialidades metanotróficas y una maquinaria enzimática capaz de acumular PHA de alta calidad, este estudio podría ser el inicio de la sustentabilidad del tratamiento CH₄ al generar un producto de valor agregado.

6.2 Conclusiones particulares

- La cepa *M. organophilum* CZ-2 aislada de un consorcio metanotrófico obtenido a partir de una planta de tratamiento de aguas residuales fue capaz de eliminar cantidades importantes de CH₄ del aire, al mismo tiempo que produce altas cantidades de PHB. Este es el primer informe de la degradación de CH₄ y producción de PHB en un TPPB por *M. organophilum*.
- La capacidad de *M. organophilum* CZ-2 de consumir CH₄ y de acumular PHA representa una alternativa interesante en el tratamiento de concentraciones bajas de este gas de efecto invernadero. Más aún, la incorporación simultánea de un cosustrato permite alterar el perfil de PHA. La acumulación de copolímeros que contienen HB, HV, HO o incluso HH representa el primer informe de los PHA sobre el CH₄ y cosustratos. El contenido de PHA ($y_{\text{PHA}} =$

0.88) es superior a los valores previamente reportados. Estos polímeros podrían brindar mejores propiedades para su aplicación industrial y un enorme potencial para la investigación sobre la caracterización y nuevas aplicaciones.

- Un modelo metabólico escala del genoma que representa el metabolismo metanotrófico fue desarrollado, las reacciones que componen el modelo son las encontradas en el metabolismo estresado bajo limitación de nitrógeno, los datos experimentales están muy cerca de los obtenidos a partir de los resultados *in silico*, en el modelo se incluyó la síntesis y degradación de los polihidroxicanoatos de cadena corta y media, la adición de citrato y propionato fue apoyada después de un análisis de flujo metabólico de 8 sustratos diferentes, y el cálculo del precio por cada mol de polímero.

Referencias

- Aaronson S (1970) *Experimental Microbial Ecology*, 1st ed. Academic Press, New York, pp. 109-111.
- Acuña M, Pérez F, Revah S (1999) Microbial and kinetic aspect of a biofilter for the removal of toluene from waste gases. *Biotechnol Bioeng.* 63:175-184.
- Agren R, Liu L, Shoaie S, Vongsangnak W, Nookaew I, Nielsen J (2013) The RAVEN Toolbox and Its Use for Generating a Genome-scale Metabolic Model for *Penicillium chrysogenum*. *PLoS Comput Biol.* 9(3): e1002980.
- Aiba S, Matsuoka M (1979) Identification of Metabolic Model - Citrate Production from Glucose by *Candida lipolytica*. *Biotechnol Bioeng.* 21(8):1373-1386.
- Apel WA., Dugan PR, Wiebe MR (1990) Use of methanotropic bacteria in gas phase bioreactors to abate methane in coal mine atmospheres. *Fuel.* 70:1001-1003.
- Arriaga S, Muñoz R, Hernández S, Guieysse B, Revah S (2006) Gaseous Hexane Biodegradation by *Fusarium solani* in Two Liquid Phase Packed-Bed and Stirred-Tank Bioreactors. *Environ Sci Technol.* 40:2390-2395.
- Asenjo JA, Suk JS (1986) Microbial conversion of methane into Poly-b-hydroxybutyrate (PHB): Growth and intracellular product accumulation in a type II methanotroph. *J Ferment Technol.* 64(4):271-278.
- Atlic A, Koller M, Scherzer D, Kutschera C, Grillo-Fernandes E, Horvat P, Chiellini E, BrauneGG G (2011) Continuous production of poly([R]-3-hydroxybutyrate) by *Cupriavidus necator* in a multistage bioreactor cascade. *Appl Microbiol Biotechnol.* 91:295–304.
- Auffray C, et al. (2009) Systems medicine: the future of medical genomics and healthcare. *Genome Med.* 1(1):2.
- Bailey JE (1991) Toward a science of metabolic engineering. *Science.* 252(5013):1668-1675.

- Beard DA, et al. (2002) Energy balance for analysis of complex metabolic networks. *Biophys J.* 83(1):79-86.
- Beg QK, et al. (2007) Intracellular crowding defines the mode and sequence of substrate uptake by *Escherichia coli* and constrains its metabolic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(31):12663-12668.
- Bengtssona S, Piscob AR, Johanssona P, Lemos PC, Reis MAM (2010) Molecular weight and thermal properties of polyhydroxyalkanoates produced from fermented sugar molasses by open mixed cultures. *J Biotechnol.* 147(3):172–179.
- Bevan CK, Selvarasu S, Andrea C, Ryu J, Lee H, Ahn J, Lee DY (2010) Genome-scale metabolic reconstruction and in silico analysis of methylotrophic yeast *Pichia pastoris* for strain improvement. *Microb Cell Fact.* 9:50. doi:10.1186/1475-2859-9-50.
- Bilbo CM, Arvin E, Holst H, Splid H (1992) Modelling the growth of methane-oxidizing bacteria in a fixed biofilm. *Wat Res.* 26(3):301-309.
- BIOPOL (2009) PHB accumulation in microorganisms general structure and properties of PHA. <http://members.rediff.com/jogsn/BP6.htm>. Visitada 02 Diciembre 2013.
- Bonarius HP, et al (1997) Flux analysis of underdetermined metabolic networks: The quest for the missing constraints. *Trends Biotechnol.* 15(8):308-314.
- Bourque D, Pomerleau Y, Groleau D (1995) High cell density production of PHB from methanol by *Methylobacterium extorquens* production of high molecular mass PHB. *Appl Microbiol Biotechnol.* 44:367-376.
- Braunegg G, Sonnleimer B, Lafferty RM (1978) A Rapid Gas Chromatographic Method for the determination of Poly-b-hydroxybutyric Acid in Microbial Biomass. *European J Appl Microbiol Biotechnol.* 6:29-37.
- Brenner DJ, Krieg NR, Stanley JT, Garrity GM (2005) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Springer, Baltimore. pp. 88.
- Carolan T, MacLeod, Daugulis AJ (2005) Interfacial effects in a two-phase partitioning bioreactor: degradation

of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by a hydrophobic *Mycobacterium*. *Process Biochem.* 40:1799-1805.

Chanprateep S (2010) Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. *J Biosci Bioeng.* 110:621-632.

Choi J, Lee SY (1997) Process analysis and economic evaluation for poly(3-hydroxybutyrate) production by fermentation. *Bioprocess Eng.* 17:335–342.

Cover MW, et al (2001) Regulation of gene expression in flux balance models of metabolism. *J Theor Biol.* 213(1):73-88.

Daugulis AJ (2001) Two-Phase partitioning bioreactors: a new technology platform for destroying xenobiotics. *Trends Biotechnol.* 19:457-462.

Dedysh SN, Dunfield PF, Trotsenko YA (2004) Methane utilization by *Methylobacterium* species: new evidence but still no proof for an old controversy. *Int J Syst Evol Microbiol.* 54:1919–1920.

Días ML et al (2008) Metabolic modelling of polyhydroxyalkanoate copolymers production by mixed microbial cultures. *BMC Sys Biol.* 2:59.

Donovan PK, Anthony C, Murrell, C (2005) Insights into the obligate methanotroph *Methylococcus capsulatus*. *Trends Microbiol.* 13(5):195-198.

Duarte NC, et al (2007) Global reconstruction of the human metabolic network based on genomic and bibliomic data. *Proc Natl Acad Sci USA.* 104(6):1777-1782.

Edwards JS, et al (2001) In silico predictions of *Escherichia coli* metabolic capabilities are consistent with experimental data. *Nat Biotechnol.* 19(2):125-130.

Fell DA, Small JR (1986) Fat synthesis in adipose tissue. An examination of stoichiometric constraints. *Biochem J.* 238(3):781-786.

Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783–791.

Flickinger MC, Drew SW (1999) *Encyclopedia of Bioprocess Technology – Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation*. Volumes 1-5. John Wiley & Sons. pp. 2024-2133.

Gandini A y Belgacem MN (2008) *Monomers, polymer and composites from renewable resources*. Elsevier, Amsterdam, Boston, pp. 451-477.

Gerbert J, Groengroeft A, Miehlisch G (2003) Kinetics of microbial landfill methane oxidation in biofilters. *Waste Manag.* 23:609-619.

Goodland R and Anhang J (2009) Livestock and climate change what if the key actors in climate change are cows, pigs and chickens? *World Watch*. 22(6):10-18.

Gunnar B, Sundh I, Tunlid A, Frostegard A, Svensson B (1998) Microbial oxidation of methane at high partial pressures in an organic landfill cover soil under different moisture regimes. *FEMS Microbiol Ecol.* 26:207-217.

Gunnar, Sundh I, Svensson B (2004) Microbial oxidation of methane at different temperatures in landfill cover soils. *FEMS Microbiol Ecol.* 48:305-312.

Hansen JE, Makiko S (2001) Trends of measured climate forcing agents. *PNAS.* 98(26):14778–14783.

Heinrich R, et al (1977) Metabolic regulation and mathematical models. *Progress in biophysics and molecular biology.* 32(1):1-82.

Helm J, Wendlandt KD, Rogge G, Kappelmeyer U (2006) Characterizing a stable methane-utilizing mixed culture used in the syntesis of high-quality biopolymer in an open system. *J Appl Microbiol.* 101:387-395.

Henry CS, et al. (2006) Genome-scale thermodynamic analysis of *Escherichia coli* metabolism. *Biophys J.* 90(4):1453-1461.

Intergovernmental Panel on Climate Change, *Climate Change, The physical sciences basics* (2013)

http://www.ipcc.ch/report/ar5/wg1/#.UIP_nhY8hDS. Visitada 8 octubre 2013.

Jiang Y, Hebly M, Kleerebezem R, Muyzer G, Van Loosdrecht M (2011) Metabolic modeling of mixed substrate uptake for polyhydroxyalkanoate (PHA) production. *Water Res.* 45:1309-1321.

Karp RM (2008) George Dantzig's impact on the theory of computation. *Discrete Optim.* 5(2):174-185.

Khalil MAK (1999) Non-CO₂ greenhouse gases in the atmosphere. *Annu Rev Energy Environ.* 24:645-661.

Kim SW, Kim P, Kim JH (1999) Production of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from *Methylobacterium organophilum* by potassium-limited fed-batch culture. *Enz Microbiol Technol.* 24:555-560.

Kim SW, Kim P, Lee HS, Kim JH (1996) High production of poly-b-hydroxybutyrate (PHB) from *Methylobacterium organophilum* under potassium limitation. *Biotech Lett.* 18(1)25-30.

Kumar S, Tamura K, Nei M (2004) MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform.* 5:150–163.

Lee SY, Middelberg AP, Lee YK (1995) Poly(3-hydroxybutyrate) production from whey using recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol Let.* 19(10):1033-1035.

Lee WH, Loo CY, Nomura CT, Sudesh K (2008) Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate copolymers from mixtures of plant oils and 3-hydroxyvalerate precursors. *Bioresourc Technol.* 99:6844– 6851.

Lewis NE, et al (2012) Constraining the metabolic genotype-phenotype relationship using a phylogeny of in silico methods. *Nat Rev Microbiol.* 10(4): 291-305.

López JC, Quijano G, Souza TS, Estrada JM, Lebrero R, Muñoz R (2013) Biotechnologies for greenhouse gases (CH₄, N₂O, and CO₂) abatement: state of the art and challenges. *Appl Microbiol Biotechnol.* 97:2277–2303.

Lu X, Vora H, Khosla C (2008) Overproduction of free acids in *E coli*: implications for biodiesel production. *Met Eng.* 10(6):333-339.

Madigan MT, Martinko JM, Parker J (2003) Brock Biología de los microorganismos 10ª Ed. Prentice Hall Iberia. España. pp. 354-366.

Malashenko YR, Pirog TP, Romanovshaya VA, Sokolov IG, Grinberg TA (2001) Search for methanotrophic producers of exopolysaccharides. *Appl Biochem Microbiol.* 37(6):599-602.

Marx CJ, Van Dien SJ, Lidstrom ME (2005) Flux analysis uncovers key role of functional redundancy in formaldehyde metabolism. *PLoS Biol.* 3(2):244-253.

McKinlay JB, et al. (2007) Prospects for a bio-based succinate industry. *Appl Microbiol Biotechnol.* 76(4):727-740.

Michaelis L, et al. (2011) The original Michaelis constant: translation of the 1913 Michaelis-Menten paper. *Biochemistry.* 50(39):8264-8269.

Mokhtari-Hosseini ZB, Vasheghani-Farahani E, Shojaosadati SA, Karimzadeh R, Heidarzadeh-Vazifekhoran A (2009) Effect of feed composition on PHB production from methanol by HCDC of *Methylobacterium extorquens* (DSMZ 1340). *J Chem Technol Biotechnol.* 84:1136-1139.

Morales M, Revah S, Auria R (1998) Star-up and the effect of gaseous ammonia additions on a biofilter for the elimination of toluene vapors. *Biotech Bioeng.* 60(4):483-491.

Mubarak A, Howald R, Woodriff R (1977) Elimination of chloride interferences with mercuric ions in the determination of nitrates by the phenoldisulfonic acid method. *Anal Chem.* 49(6):857-860.

Muñoz R, Villaverde S, Guieysse B, Revah S (2007) Two-phase partitioning bioreactors for treatment of volatile organic compounds. *Biotechnol Adv.* 25:410-422.

Murrell JC y Radajewski S (2000) Cultivation-independent techniques for studying methanotroph ecology. *Res Microbiol.* 151:807-814.

Nath A, Dixit M, Bandiya A, Chavda S, Desai AJ (2008) Enhanced PHB production and scale up studies using cheese whey in fed batch culture of *Methylobacterium sp.* ZP24. *Bioresource Technol.* 99:5749-5755.

Nielsen J (2001) Physiological engineering aspects of penicillium chrysogenum. Denmark. Polyteknisk forlag. pp 288.

Nielsen J, Jorgensen HS (1995) Metabolic control analysis of the penicillin biosynthetic pathway in a high-yielding strain of Penicillium chrysogenum. Biotechnol Prog. 11(3):299-305.

Nikiema J, Bibeau L, Brzezinski R, Heitz M (2006) Biofiltration of methane: An experimental study. Chem Eng J. 113:111-117.

Nikiema J, Brzezinski R, Heitz M (2007) Elimination of methane generated from landfills by biofiltration: a review. Rev Environ Sci Biotechnol. 6:261-284.

Nogales J, Palsson BO, Thiele I (2008) A genome-scale metabolic reconstruction of *Pseudomonas putida* KT2440:iJN746 as a cell factory. BMC Sys Biol. 2:79.

Ogata H, et al. (1999) KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Nucleic Acids Res. 27(1):29-34.

Ostle A, Holt JG (1982) Nile Blue A as a Fluorescent Satin for Poly-b-Hydroxybutyrate. Appl Environ Microbiol. 44(1):238-241.

Othmer HG (1976) The qualitative dynamics of a class of biochemical control circuits. J Mat Biol. 3(1):53-78.

Pardelha F, Albuquerque MGE, Reis MAM, Dias JML, Oliveira R (2012) Flux balance analysis of mixed microbial cultures: Application to the production of polyhydroxyalkanoates from complex mixtures of volatile fatty acids. J Biotechnol. 162:336–345.

Pawlowska M y Stepniewski (2006) An influence of methane concentration on the methanotrophic activity of a model landfill cover. Ecol Eng. 26:392-395.

Peyraud R, Schneider K, Kiefer P, Massou S, Vorholt JA, Portais JC (2011) Genome-scale reconstruction and system level investigation of the metabolic network of *Methylobacterium extorquens* AM1. BMC Sys Biol. 5:189.

Price ND, et al (2004) Genome-scale models of microbial cells: evaluating the consequences of constraints. Nat Rev Microbiol. 2(11):886-897.

Reinoud S (1998) Methane production and methane consumption: a review of processes underlying wetland methane fluxes. Biogeochem. 41:23-51.

Revah S, Morgan-Sagastume JM (2005) Methods for odor and VOC control. In: Z. Shareefdeen and A. Singh, Editors, Biotechnology For Odour And Air Pollution. Springer-Verlag. Heidelberg. Germany. pp. 29–64.

Revah SM, Ortiz LI (2004) Fundamentos de casos exitosos de biotecnología moderna. Colegio Nacional. México DF. pp. 625-658.

Riis V, Mai W (1988) Gas chromatographic determination of poly-b-hidroxitubiric acid in microbial biomass after hydrochloric acid propanolysis. J Chrom. 445:285-289.

Rocha-Ríos J, Sergio B, Sergio H, Sergio R (2009) Methane degradation in two-phase partition bioreactors. Chem Eng J. 152:289-292.

Rocha-Rios J, et al (2013) Methane biodegradation in a two-phase partition internal loop airlift reactor with gas recirculation. J Chem Tech Biotechnol. DOI: 10.1002/jctb.2523.

Rocha-Rios J, Muñoz R, Revah S (2010) Effect of silicone oil fraction and stirring rate on methane degradation in a stirred tank reactor. J Chem Technol Biotechnol. 85(3):314-319.

Rodríguez AS, Valdman B, Madereiros SA (2009) Analysis of methane biodegradation by *Methylosinus trichosporium* OB3b. Brazilian J Microbiol 40:301-307.

Saitou N y Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol. 4:406–425.

Scheutz-C, Kjeldsen P, Bogner JA, De Visscher A, Gebert J, Hilger HA, Huber-Humer M, Spokas K (2009) Microbial methane oxidation processes and technologies for mitigation of landfill gas

emissions. *Waste Manage Res.* 27:409–455. doi:10.1177/0734242X09339325.

Schilling CH, et al. (1999) Metabolic pathway analysis: basic concepts and scientific applications in the post-genomic era. *Biotechnol Prog.* 15(3):296-303.

Schuetz R, et al (2012) Multidimensional optimality of microbial metabolism. *Science.* 336(6081):601-604.

SEMARNAT, INE (2006) Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología México tercera comunicación nacional ante la convención marco de las naciones unidas sobre el cambio climático. pp 52-57.

Serafim LS, Lemos PC, Albuquerque MGE, Reis MAM (2008) Strategies for PHA production by mixed cultures and renewable waste materials. *Appl Microbiol Biotechnol.* 81:615–628.

Shah NN, Hanna ML, Taylos RT (1996) Batch cultivation of *Methylosinus trichosporium* OB3b: Characterization of PHB production under methane-dependent grown conditions. *Biotech Bioeng.* 49:161-171.

Steen EJ, Chan R, Prasad N, Myers S, Petzold CJ, Redding A, Ouellet M, Keasling JD (2008) Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of n-butanol. *Microb Cell Fact.* 7:36.

Steen EJ, Kang Y, Bokinsky G, Hu Z, Schirmer A, McClure A, Del Cardayre SB, Keasling JD (2010) Microbial production of fatty- acid-derived fuels and chemicals from plant biomass. *Nature.* 463:559–562.

Stephanopoulos G, et al. (1998) *Metabolic engineering: principles and methodologies.* San Diego. Academic Press.

Suzuki T, Yamane T, Shimizu S (1986) Mass production of poly- β -hydroxybutyric acid by fully automatic fed-batch culture of methylotroph. *Appl Microbiol Biotechnol.* 24:366-369.

Theisen AR, Murrell JC (2005) Facultative methanotrophs revisited. *J Bacteriol.* 187:4303-4305.

Thiele I, Palsson BO (2010) A protocol for generating a high-quality genome-scale metabolic reconstruction.

Nat Protoc. 5(1):93-121.

Thomson JD, Higgins DG, Gibson TG (2004) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673–4680.

Tomita M, et al (1997) E-CELL: Software Environment for Whole Cell Simulation, *Genome informatics. Workshop on Genome Informatics*, 8. pp. 147-155.

Trends in atmospheric CH₄ (2008) <http://zipcodezoo.com/Trends/Trends%20in%20Atmospheric%20Methane>, visitada el 10 diciembre de 2013.

Van Dien S y Lidstrom M (2002) Stoichiometric model for evaluating the metabolic capabilities of the facultative methylotroph *Methylobacterium extorquens* AM1, with application to reconstruction of C3 and C4 metabolism. *Biotech Bioeng.* 78(3):296-312.

Varma A, Palsson BO (1994b) Metabolic Flux Balancing-Basic Concepts, Scientific and Practical Use. *Nat Biotechnol.* 12(10):994-998.

Varma, A. and Palsson, B.O. (1994a) Stoichiometric flux balance models quantitatively predict growth and metabolic by-product secretion in wild-type *Escherichia coli* W3110. *Appl Environ Microbiol.* 60(10):3724-3731.

Visscher AD, Cleemput OV (2003) Induction of enhanced methane oxidation in soils: NH₄⁺ inhibition patterns. *Soil Biol Biochem.* 35:907-913.

Wang J, Bakken L (1998) Screening of soil bacteria for poly-β-hydroxybutyric acid production and its role in the survival of starvation. *Microbiol Ecol.* 35:94-101.

Watanabe I, Hashimoto T, Shimoyama A (1997) Methane-oxidizing activities and methanotrophic populations associated with wetland rice plants. *Bio Fertil Soils.* Springer-Verlag. 24:261-265.

Wegen R, Lee S, Middelberg A (2000) Metabolic and Kinetic Analysis of Poly(3-Hydroxybutyrate) Production

by Recombinant *Escherichia coli*. *Biotech Bioeng.* 74(1):70-81.

Wendland KD, Jechorek M, Helm J, Stottmeister U (2001) Producing poly-3-hydroxybutyrate with a high molecular mass from methane. *J Biotechnol.* 86:127-133.

Wilshusen JH, Hettiaratchi JPA, Stein VB (2004) Long-term behavior of passively aerated compost methanotrophic biofilter columns. *Waste Manag.* 24:643-653.

Xing X, Wu H, Luo M, Wang B (2006) Effects of organic chemicals on growth of *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Biochem Eng J.* 31:113-117.

Yeza A, Fournier D, Halasz A, Hawari J (2006) Production of polyhydroxyalkanoates from methanol by a new methylotrophic bacterium *Methylobacterium* sp. GW2. *Appl Microbiol Biotechnol.* 73:211-218.

Zenhao D, Moller N, Green J, Weare J (1992) The prediction of methane solubility in natural waters to high ionic strength from 0 to 250 °C and from 0 to 1600 bar. *Geochim Cosmochim Acta.* 56:1451-1460.

Zhanga Y, Xina C, Chenb L, Songa H, Xia C (2008) Biosynthesis of poly-3-hydroxybutyrate with a high molecular weight by methanotroph from methane and methanol. *J Nat Gas Chem.* 17:103-109.

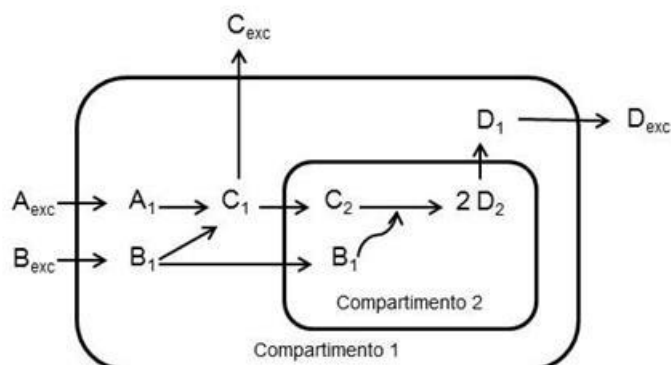
Zúñiga C, Morales M, Revah S (2013) Polyhydroxyalkanoates accumulation by *Methylobacterium organophilum* CZ-2 during methane degradation using citrate or propionate as cosubstrates. *Bioresource Technol.* 129, 686–689.

Zúñiga C, Morales M, Le Borgne S, Revah S (2011) Production of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) by *Methylobacterium organophilum* isolated from a methanotrophic consortium in a two-phase partition bioreactor. *J Hazard Mat.* 190:876-882.

Anexo 1. Ejemplo AFM red metabólica hipotética.

La siguiente sección describe la metodología con una pequeña red metabólica hipotética

A) Representación gráfica



Reacciones

r_1	$A_{exc} \Rightarrow A_1$
r_2	$B_{exc} \Rightarrow B_1$
r_3	$A_1 \Rightarrow C_1$
r_4	$C_1 \Rightarrow C_{exc}$
r_5	$B_1 \Rightarrow C_1$
r_6	$C_1 \Rightarrow C_2$
r_7	$B_1 \Rightarrow B_2$
r_8	$C_2 + B_2 \Rightarrow 2 D_2$
r_9	$D_2 \Rightarrow D_1$
r_{10}	$D_1 \Rightarrow D_{exc}$

B)

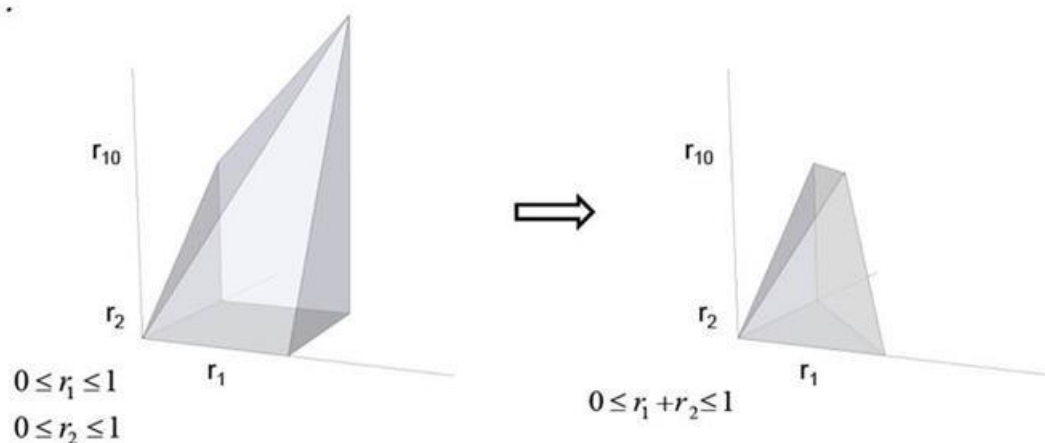


Figura A1-1. Principios de AFM. A) Una red metabólica que está compuesta por 10 reacciones (de los cuales 6 son internas), 11 metabolitos (de los cuales 7 son internos) y contiene dos compartimentos. Los subíndices de los metabolitos indican qué compartimento al que pertenezcan. R_1 , R_2 , R_4 y R_{10} son reacciones de intercambio. R_6 , R_7 y R_9 son reacciones que transportan metabolitos entre compartimentos. Tenga en cuenta que, mientras que, por ejemplo, C_1 y C_2 representan el mismo compuesto químico que se consideran como metabolitos únicos para los propósitos de modelado. También tenga en cuenta que la estequiometría de las conversiones enzimáticas se expresan en la red (ver r_8). B) El espacio de la solución factible se muestra para las reacciones r_1 , r_2 , y r_{10} . Todos los puntos del cono gris representan soluciones viables

dadas las restricciones. Como se imponen restricciones adicionales del espacio de soluciones se hace más estrecho.

Un balance de masa para cada metabolito queda en forma:

$$\text{Acumulación} = \text{entrada} - \text{salida} + \text{genera} - \text{consume} - \text{dilución} \quad (1)$$

$$\frac{dx_i}{dt} = v_{\text{entrada},i} - v_{\text{salida},i} + v_{\text{generación},i} - v_{\text{consumo},i} - \mu X_i \quad (2)$$

En la ec. 2 la tasa de acumulación del metabolito x_i se define como la tasa en la que se recoge ($v_{\text{entrada},i}$), menos la tasa por la cual se elimina ($v_{\text{salida},i}$), más la tasa en la que se genera ($v_{\text{generación},i}$) y menos la tasa en la que se consume ($v_{\text{consumo},i}$). El término dilución (μx_i) representa la disminución de la concentración que proviene del hecho de que una célula se expande a medida crece. Debido a que las concentraciones intracelulares de la mayoría de los metabolitos son flujos muy bajos en comparación con las que los afectan, el término dilución generalmente se puede despreciar (Stephanopoulos et al., 1998).

Para el metabolito D_2 en la figura anterior, la ecuación sería la siguiente:

$$\frac{dD_2}{dt} = 2r_8 - r_9 \quad (3)$$

Esta relación se puede expresar en una notación matricial para representar los balances de masa para todos metabolitos:

$$\frac{dx}{dt} = S \cdot v \quad (4)$$

En (4) S es una matriz que contiene los coeficientes estequiométricos que definen la red metabólica. Esta matriz se conoce como la matriz estequiométrica; v es un vector con la tasa de cada reacción y x es un vector con los cambios resultantes en las concentraciones con respecto al tiempo para cada uno de los metabolitos internos. El AFM se basa en la suposición de que la escala de tiempo para los cambios en los pools de metabolito internos (típicamente segundos o minutos) es mucho más rápido que la escala de tiempo para el crecimiento o para los cambios en el medio ambiente (típicamente minutos o horas). Por lo tanto, es razonable suponer que los metabolitos son internos en estado estacionario (lo que significa que su cambio en la

concentración es 0) (Varma y Palsson, 1994b). La ecuación (4) a continuación, se simplifica a:

$$0 = S \cdot v \quad (5)$$

Para la ruta metabólica antes presentada, la representación sería la siguiente:

$$\begin{bmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix} = \begin{matrix} A_1 \\ B_1 \\ C_1 \\ C_2 \\ B_2 \\ D_2 \\ D_1 \end{matrix} \begin{bmatrix} 1 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 & -1 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & -1 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & -1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 2 & -1 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} r_1 \\ r_2 \\ r_3 \\ r_4 \\ r_5 \\ r_6 \\ r_7 \end{bmatrix} \quad (6)$$

En AFM el objetivo ahora habría sido medir un número suficientemente grande de flujos para tener un modelo determinado. Con 10 variables (los flujos desconocidos) y 7 ecuaciones (balances de masa alrededor de los metabolitos internos) el sistema tiene $10 - 7 = 3$ grados de libertad (si todas las reacciones fueron linealmente independientes). Por lo tanto, los tres flujos tendrían que ser medidos. En AFM el objetivo es limitar el sistema para reducir el conjunto de distribuciones de flujo factibles. Además, una restricción adicional y fundamental es impuesta por la termodinámica (por ejemplo, la reversibilidad o irreversibilidad efectiva de las reacciones). En el ejemplo de red todas las reacciones son irreversibles y por lo tanto, sostiene que:

$$v \geq 0 \quad (7)$$

Tres criterios que deben cumplirse para el AFM: 1) la red metabólica debe representar correctamente las capacidades metabólicas del organismo en estudio, 2) las restricciones deben explicar correctamente las limitaciones fisiológicas bajo las que el sistema funciona, 3) la función objetivo debe describir correctamente el objetivo que se desea para la célula. El primer punto se analiza en detalle en la reconstrucción GEMM. Los siguientes puntos se discuten a continuación:

Figura A1-1(b) muestra el efecto de imponer restricciones adicionales sobre el modelo, en la parte izquierda de la figura las tasas de consumo de los metabolitos A1 y B1 están restringidas a ser ≤ 1 . Estas restricciones definen un cono viable de soluciones, que se muestra en gris, se debe tomar en cuenta que no se permiten todas las combinaciones de valores para R_1 , R_2 y R_{10} , ya que sus relaciones se definen por la estequiometría de las reacciones.

Las restricciones más utilizadas en el consumo o excreción y se basan generalmente en los flujos medidos experimentalmente. En lado derecho de la figura una restricción

adicional se ha impuesto, la cual establece que la suma de R_1 y R_2 debe ser ≤ 1 . Esto corta el cono y reduce aún más el conjunto de distribuciones de flujo permitidos. Ha habido muchos intentos de definir restricciones que son biológicamente relevantes y que no requieren de mediciones in vivo de capacidades enzimáticas que son costosas y difíciles de realizar. Ejemplos de restricciones incluyen: limitaciones físicas, tales como velocidades de difusión; los límites de las enzimas (Beg et al., 2007). Limitaciones reguladoras en las que las enzimas pueden estar activas bajo una condición dada (Covert et al., 2001); equilibrio de la energía para excluir termodinámicamente soluciones no factibles (Beard et al., 2002); limitaciones termodinámicas basadas en las energías libres de formación (ΔG_f^0) en condiciones estándar para metabolitos (Henry et al., 2006).

Pero ¿Cómo hace una célula para ajustar sus flujos intracelulares, dadas las limitaciones que tiene? En AFM se supone que las funciones del metabolismo celular de acuerdo con algún objetivo, y que dicho objetivo se puede definir como una combinación lineal de las velocidades de reacción

$$\text{Maximizar } c^T v$$

$$\text{Sujeto a: } 0 = S \cdot v$$

$$\text{Límites inferiores } \leq v \leq \text{límites superiores} \quad (8)$$

En la ec. 8, c es un vector con coeficientes para cada una de las reacciones. La $c^T v$ es una expresión que a continuación, se convierte en el producto del flujo y el coeficiente objetivo, sumado sobre todas las reacciones. El sistema definido por la ec. 8 se puede resolver de manera eficiente, también en caso de grandes rutas, mediante el uso de programación lineal (Karp, 2008). Ha habido muchos estudios sobre lo que constituye una buena función objetivo. Algunas de las primeras sugerencias fueron bastante simples, como maximizar la producción de NADPH o reducir al mínimo la producción de ATP (Bonarius et al., 1997). Cuando la composición molecular de la biomasa se cuantificó con suficiente detalle para hacer posible utilizar la maximización del crecimiento como un objetivo (Varma y Palsson, 1994a). Este objetivo resultó ser una aproximación muy buena, y aún sigue siendo, el objetivo más utilizado para el modelado de las células microbianas. Los objetivos más complejos, tales como la maximización de la producción de entropía (Henry et al., 2006) o combinaciones de varios de los objetivos mencionados aquí (Schuetz et al., 2012) se han propuesto desde entonces, en el caso del modelo estequiométrico presentado en esta tesis la función objetivo seleccionada fue la producción de polihidroxicanoatos, tanto de

homopolímeros de PHB como en copolímeros de diferentes hidroxialcanoatos, hasta moléculas de 8 carbonos.

La idea de que un sistema complejo como una célula viva pueda ser modelado a partir de un pequeño conjunto de limitaciones fisiológicas y en objetivos generales resulta atractivo para la optimización de procesos.

Anexo 2. Listado de reacciones incluidas en el modelo.

Tabla A2-1. Reacciones incluidas en el modelo.

ID	COMPARTIMENTO	REACCIÓN
1	Periplasma	methane[Periplasm] + O2[Periplasm] => H2O[Periplasm] + methanol[Periplasm]
2	Periplasma	methanol[Periplasm] + 2 oxidized-cytochrome-c[Cytoplasm] => formaldehyde[Periplasm] + 2 H(+)[Periplasm] + 2 reduced-cytochrome-c[Cytoplasm]
3	Citoplasma	formaldehyde[Cytoplasm] + tetrahydrofolate[Cytoplasm] => 5,10-methylenetetrahydrofolate[Cytoplasm] + H2O[Cytoplasm]
4	Citoplasma	formaldehyde[Cytoplasm] + tetrahydromethanopterin[Cytoplasm] => 5,10-methylenetetrahydromethanopterin[Cytoplasm] + H2O[Cytoplasm]
5	Citoplasma	5,10-methylenetetrahydromethanopterin[Cytoplasm] + NADP(+)[Cytoplasm] => 5,10-methenyltetrahydromethanopterin[Cytoplasm] + NADPH[Cytoplasm] + H(+)[Cytoplasm]
6	Citoplasma	5,10-methylenetetrahydromethanopterin[Cytoplasm] + NAD(+)[Cytoplasm] => 5,10-methenyltetrahydromethanopterin[Cytoplasm] + NADH[Cytoplasm] + H(+)[Cytoplasm]
7	Citoplasma	5-formyltetrahydromethanopterin[Cytoplasm] <=> 5,10-methenyltetrahydromethanopterin[Cytoplasm] + H2O[Cytoplasm]
8	Citoplasma	methanofuran[Cytoplasm] + 5-formyltetrahydromethanopterin[Cytoplasm] => tetrahydromethanopterin[Cytoplasm] + formylmethanofuran[Cytoplasm]
9	Citoplasma	formylmethanofuran[Cytoplasm] + H2O[Cytoplasm] => formate[Cytoplasm] + methanofuran[Cytoplasm]
10	Citoplasma	formate[Cytoplasm] + NAD(+)[Cytoplasm] => CO2[Cytoplasm] + NADH[Cytoplasm] + H(+)[Cytoplasm]
11	Citoplasma	10-formyltetrahydrofolate[Cytoplasm] + ADP[Cytoplasm] + phosphate[Cytoplasm] <=> formate[Cytoplasm] + ATP[Cytoplasm] + tetrahydrofolate[Cytoplasm]
12	Citoplasma	5,10-methenyltetrahydrofolate[Cytoplasm] + H2O[Cytoplasm] <=> 10-formyltetrahydrofolate[Cytoplasm] + H(+)[Cytoplasm]
13	Citoplasma	5,10-methylenetetrahydrofolate[Cytoplasm] + NADP(+)[Cytoplasm] <=> 5,10-methenyltetrahydrofolate[Cytoplasm] + NADPH[Cytoplasm]
14	Citoplasma	5,10-methylenetetrahydrofolate[Cytoplasm] + glycine[Cytoplasm] + H2O[Cytoplasm] <=> tetrahydrofolate[Cytoplasm] + L-serine[Cytoplasm]
15	Citoplasma	L-serine[Cytoplasm] + glyoxylate[Cytoplasm] => hydroxypyruvate[Cytoplasm] + glycine[Cytoplasm]

16	Citoplasma	hydroxypyruvate[Cytoplasm] + NADH[Cytoplasm] + H(+)[Cytoplasm] <=> D-glycerate[Cytoplasm] + NAD(+)[Cytoplasm]
17	Citoplasma	D-glycerate[Cytoplasm] + ATP[Cytoplasm] => 2-phospho-D-glycerate[Cytoplasm] + ADP[Cytoplasm]
18	Citoplasma	2-phospho-D-glycerate[Cytoplasm] <=> phosphoenolpyruvate[Cytoplasm] + H2O[Cytoplasm]
19	Citoplasma	oxaloacetate[Cytoplasm] + phosphate[Cytoplasm] <=> phosphoenolpyruvate[Cytoplasm] + CO2[Cytoplasm] + H2O[Cytoplasm]
20	Citoplasma	(S)-malate[Cytoplasm] + NAD(+)[Cytoplasm] <=> oxaloacetate[Cytoplasm] + NADH[Cytoplasm] + H(+)[Cytoplasm]
21	Citoplasma	(S)-malate[Cytoplasm] + CoA[Cytoplasm] + ATP[Cytoplasm] => (S)-malyl-CoA[Cytoplasm] + ADP[Cytoplasm] + phosphate[Cytoplasm]
22	Citoplasma	(S)-malyl-CoA[Cytoplasm] <=> acetyl-CoA[Cytoplasm] + glyoxylate[Cytoplasm]
23	Citoplasma	2 acetyl-CoA[Cytoplasm] => CoA[Cytoplasm] + acetoacetyl-CoA[Cytoplasm]
24	Citoplasma	acetoacetyl-CoA[Cytoplasm] + NADPH[Cytoplasm] + H(+)[Cytoplasm] <=> (R)-3-hydroxybutanoyl-CoA[Cytoplasm] + NADP(+)[Cytoplasm]
25	Citoplasma	succinyl-CoA[Cytoplasm] + acetoacetate[Cytoplasm] <=> succinate[Cytoplasm] + acetoacetyl-CoA[Cytoplasm]
26	Citoplasma	acetoacetyl-CoA[Cytoplasm] + acetate[Cytoplasm] <=> acetyl-CoA[Cytoplasm] + acetoacetate[Cytoplasm]
27	Citoplasma	pyruvate[Cytoplasm] + H2O[Cytoplasm] + 2 oxidized-cytochrome-c[Cytoplasm] => acetate[Cytoplasm] + CO2[Cytoplasm] + 2 reduced-cytochrome-c[Cytoplasm] + 2 H(+)[Cytoplasm]
28	Citoplasma	ATP[Cytoplasm] + acetate[Cytoplasm] + CoA[Cytoplasm] => AMP[Cytoplasm] + diphosphate[Cytoplasm] + acetyl-CoA[Cytoplasm]
29	Citoplasma	propionyl-CoA[Cytoplasm] + oxaloacetate[Cytoplasm] <=> pyruvate[Cytoplasm] + (R)-methylmalonyl-CoA[Cytoplasm]
30	Citoplasma	crotonyl-CoA[Cytoplasm] + NADPH[Cytoplasm] + H(+)[Cytoplasm] + CO2[Cytoplasm] <=> (2S)-ethylmalonyl-CoA[Cytoplasm] + NADP(+)[Cytoplasm]
31	Citoplasma	crotonyl-CoA[Cytoplasm] + NADPH[Cytoplasm] + H(+)[Cytoplasm] <=> butyryl-CoA[Cytoplasm] + NADP(+)[Cytoplasm]
32	Citoplasma	ATP[Cytoplasm] + butyryl-CoA[Cytoplasm] + HCO3(-)[Cytoplasm] + H(+)[Cytoplasm] => ADP[Cytoplasm] + phosphate[Cytoplasm] + (2S)-ethylmalonyl-CoA[Cytoplasm]
33	Citoplasma	(2S)-ethylmalonyl-CoA[Cytoplasm] <=> (2S)-methylsuccinyl-CoA[Cytoplasm]
34	Citoplasma	mesaconyl-CoA[Cytoplasm] + H2O[Cytoplasm] <=> erythro-b-methylmalyl-CoA[Cytoplasm]
35	Citoplasma	(2S)-methylsuccinyl-CoA[Cytoplasm] + oxidized-ETF[Cytoplasm] <=> mesaconyl-CoA[Cytoplasm] + reduced-ETF[Cytoplasm]
36	Citoplasma	propionyl-CoA[Cytoplasm] + glyoxylate[Cytoplasm] <=> erythro-b-methylmalyl-CoA[Cytoplasm]
37	Citoplasma	ATP[Cytoplasm] + propionyl-CoA[Cytoplasm] + HCO3(-)[Cytoplasm] + H(+)[Cytoplasm] => ADP[Cytoplasm] + phosphate[Cytoplasm] + (S)-methylmalonyl-CoA[Cytoplasm]

38	Citoplasma	(S)-methylmalonyl-CoA[Cytoplasm] <=> (R)-methylmalonyl-CoA[Cytoplasm]
39	Citoplasma	succinyl-CoA[Cytoplasm] <=> (R)-methylmalonyl-CoA[Cytoplasm]
40	Citoplasma	acetyl-CoA[Cytoplasm] + H2O[Cytoplasm] + oxaloacetate[Cytoplasm] => citrate[Cytoplasm] + CoA[Cytoplasm]
41	Citoplasma	citrate[Cytoplasm] <=> threo-D-isocitrate[Cytoplasm]
42	Citoplasma	threo-D-isocitrate[Cytoplasm] + NADP(+)[Cytoplasm] => 2-oxoglutarate[Cytoplasm] + CO2[Cytoplasm] + NADPH[Cytoplasm] + H(+)[Cytoplasm]
43	Citoplasma	2-oxoglutarate[Cytoplasm] + CoA[Cytoplasm] + NAD(+)[Cytoplasm] <=> succinyl-CoA[Cytoplasm] + CO2[Cytoplasm] + NADH[Cytoplasm] + H(+)[Cytoplasm]
44	Citoplasma	succinyl-CoA[Cytoplasm] + H2O[Cytoplasm] <=> CoA[Cytoplasm] + succinate[Cytoplasm]
45	Citoplasma	succinate[Cytoplasm] + UQ[Cytoplasm] <=> fumarate[Cytoplasm] + UQH2[Cytoplasm]
46	Citoplasma	fumarate[Cytoplasm] + H2O[Cytoplasm] => (S)-malate[Cytoplasm]
47	Citoplasma	(S)-malate[Cytoplasm] + NAD(+)[Cytoplasm] <=> pyruvate[Cytoplasm] + CO2[Cytoplasm] + NADH[Cytoplasm] + H(+)[Cytoplasm]
48	Citoplasma	pyruvate[Cytoplasm] + CoA[Cytoplasm] + NAD(+)[Cytoplasm] <=> acetyl-CoA[Cytoplasm] + CO2[Cytoplasm] + NADH[Cytoplasm] + H(+)[Cytoplasm]
49	Citoplasma	oxaloacetate[Cytoplasm] => pyruvate[Cytoplasm] + CO2[Cytoplasm]
50	Citoplasma	ATP[Cytoplasm] + succinate[Cytoplasm] + CoA[Cytoplasm] => ADP[Cytoplasm] + phosphate[Cytoplasm] + succinyl-CoA[Cytoplasm]
51	Citoplasma	(S)-malate[Cytoplasm] + UQ[Cytoplasm] => oxaloacetate[Cytoplasm] + UQH2[Cytoplasm]
52	Citoplasma	crotonyl-CoA[Cytoplasm] + H2O[Cytoplasm] <=> (R)-3-hydroxybutanoyl-CoA[Cytoplasm]
53	Citoplasma	ATP[Cytoplasm] + pyruvate[Cytoplasm] + phosphate[Cytoplasm] <=> AMP[Cytoplasm] + phosphoenolpyruvate[Cytoplasm] + diphosphate[Cytoplasm]
54	Citoplasma	(S)-3-hydroxybutanoyl-CoA[Cytoplasm] <=> (R)-3-hydroxybutanoyl-CoA[Cytoplasm]
55	Citoplasma	acetoacetyl-CoA[Cytoplasm] + NADH[Cytoplasm] + H(+)[Cytoplasm] <=> (S)-3-hydroxybutanoyl-CoA[Cytoplasm] + NAD(+)[Cytoplasm]
56	Citoplasma	(S)-3-hydroxybutanoyl-CoA[Cytoplasm] <=> crotonyl-CoA[Cytoplasm] + H2O[Cytoplasm]
57	Citoplasma	propionate[Cytoplasm] + ATP[Cytoplasm] + CoA[Cytoplasm] => AMP[Cytoplasm] + propionyl-CoA[Cytoplasm] + diphosphate[Cytoplasm]
58	Externos	methane[External] => methane[Periplasm]
59	Externos	methanol[External] => methanol[Periplasm]

60	Externos	$\text{citrate}[\text{External}] \Rightarrow \text{citrate}[\text{Cytoplasm}]$
61	Externos	$\text{propionate}[\text{External}] \Rightarrow \text{propionate}[\text{Cytoplasm}]$
62	Externos	$\text{glyoxylate}[\text{External}] \Rightarrow \text{glyoxylate}[\text{Cytoplasm}]$
63	Externos	$\text{acetate}[\text{External}] \Rightarrow \text{acetate}[\text{Cytoplasm}]$
64	Externos	$\text{succinate}[\text{External}] \Rightarrow \text{succinate}[\text{Cytoplasm}]$
65	Externos	$\text{fumarate}[\text{External}] \Rightarrow \text{fumarate}[\text{Cytoplasm}]$
66	Externos	$\text{formate}[\text{External}] \Rightarrow \text{formate}[\text{Cytoplasm}]$
67	Externos	$\text{CoA}[\text{External}] \Rightarrow \text{CoA}[\text{Cytoplasm}]$
68	Externos	$\text{O}_2[\text{External}] \Rightarrow \text{O}_2[\text{Periplasm}]$
69	Externos	$\text{phosphate}[\text{External}] \Rightarrow \text{phosphate}[\text{Periplasm}]$
70	Externos	$\text{CO}_2[\text{Cytoplasm}] \Rightarrow \text{HCO}_3^-[\text{Cytoplasm}]$
71	Periplasma	$\text{phosphate}[\text{Periplasm}] + \text{ATP}[\text{Cytoplasm}] + \text{H}_2\text{O}[\text{Cytoplasm}] \Rightarrow 2 \text{ phosphate}[\text{Cytoplasm}] + \text{ADP}[\text{Cytoplasm}]$
72	Periplasma	$\text{O}_2[\text{Periplasm}] \Leftrightarrow \text{O}_2[\text{Cytoplasm}]$
73	Periplasma	$\text{CO}_2[\text{Periplasm}] \Leftrightarrow \text{CO}_2[\text{Cytoplasm}]$
74	Periplasma	$\text{formaldehyde}[\text{Periplasm}] \Leftrightarrow \text{formaldehyde}[\text{Cytoplasm}]$
75	Externos	$\text{CO}_2[\text{Periplasm}] \Rightarrow \text{CO}_2[\text{External}]$
76	Periplasma	$\text{H}_2\text{O}[\text{Cytoplasm}] \Leftrightarrow \text{H}_2\text{O}[\text{Periplasm}]$
77	Externos	$\text{H}_2\text{O}[\text{Cytoplasm}] \Leftrightarrow \text{H}_2\text{O}[\text{External}]$
78	Citoplasma	$\text{H}^+[\text{Cytoplasm}] \Leftrightarrow \text{H}^+[\text{Periplasm}]$
79	Externos	$\text{H}^+[\text{Cytoplasm}] \Rightarrow \text{H}^+[\text{External}]$
80	Externos	$\text{AMP}[\text{Cytoplasm}] \Rightarrow \text{AMP}[\text{External}]$
81	Externos	$\text{PHA}(n)[\text{Cytoplasm}] \Rightarrow \text{PHA}(n)[\text{External}]$

82	Externos	$\text{PHB}(n)[\text{External}] \Rightarrow 0.78 \text{ 3HB}(n)[\text{Cytoplasm}] + 0.13 \text{ 3HV}(n)[\text{Cytoplasm}] + 0.09 \text{ 3HO}(n)[\text{Cytoplasm}]$
83	Periplasma	$2 \text{ UQH}_2[\text{Cytoplasm}] + \text{O}_2[\text{Cytoplasm}] + 4 \text{ HH}(+)[\text{Cytoplasm}] \Rightarrow 2 \text{ UQ}[\text{Cytoplasm}] + 2 \text{ H}_2\text{O}[\text{Cytoplasm}] + 4 \text{ HH}(+)[\text{Periplasm}]$
84	Citoplasma	$\text{reduced-ETF}[\text{Cytoplasm}] + \text{UQ}[\text{Cytoplasm}] \Leftrightarrow \text{oxidized-ETF}[\text{Cytoplasm}] + \text{UQH}_2[\text{Cytoplasm}]$
85	Citoplasma	$\text{diphosphate}[\text{Cytoplasm}] + \text{H}_2\text{O}[\text{Cytoplasm}] \Rightarrow 2 \text{ phosphate}[\text{Cytoplasm}]$
86	Citoplasma	$2 \text{ oxidized-ferredoxin}[\text{Cytoplasm}] + \text{NADPH}[\text{Cytoplasm}] \Leftrightarrow 2 \text{ reduced-ferredoxin}[\text{Cytoplasm}] + \text{NADP}(+)[\text{Cytoplasm}] + \text{HH}(+)[\text{Cytoplasm}]$
87	Citoplasma	$2 \text{ reduced-ferredoxin}[\text{Cytoplasm}] + 2 \text{ HH}(+)[\text{Cytoplasm}] + \text{UQ}[\text{Cytoplasm}] \Rightarrow 2 \text{ oxidized-ferredoxin}[\text{Cytoplasm}] + \text{UQH}_2[\text{Cytoplasm}]$
88	Citoplasma	$\text{UQ}[\text{Cytoplasm}] + \text{NADH}[\text{Cytoplasm}] + \text{HH}(+)[\text{Cytoplasm}] \Rightarrow \text{UQH}_2[\text{Cytoplasm}] + \text{NAD}(+)[\text{Cytoplasm}]$
89	Periplasma	$\text{diphosphate}[\text{Cytoplasm}] + \text{H}_2\text{O}[\text{Cytoplasm}] + \text{HH}(+)[\text{Cytoplasm}] \Rightarrow 2 \text{ phosphate}[\text{Cytoplasm}] + \text{HH}(+)[\text{Periplasm}]$
90	Periplasma	$\text{ADP}[\text{Cytoplasm}] + \text{phosphate}[\text{Cytoplasm}] + 4 \text{ HH}(+)[\text{Periplasm}] \Rightarrow \text{ATP}[\text{Cytoplasm}] + \text{H}_2\text{O}[\text{Cytoplasm}] + 4 \text{ HH}(+)[\text{Cytoplasm}]$
91	Periplasma	$2 \text{ reduced-cytochrome-c}[\text{Cytoplasm}] + 0.5 \text{ O}_2[\text{Cytoplasm}] + 4 \text{ HH}(+)[\text{Cytoplasm}] \Rightarrow 2 \text{ oxidized-cytochrome-c}[\text{Cytoplasm}] + 1 \text{ H}_2\text{O}[\text{Cytoplasm}] + 4 \text{ HH}(+)[\text{Periplasm}]$
92	Periplasma	$1 \text{ UQH}_2[\text{Cytoplasm}] + 0.5 \text{ O}_2[\text{Cytoplasm}] + 4 \text{ HH}(+)[\text{Cytoplasm}] \Rightarrow 1 \text{ UQ}[\text{Cytoplasm}] + 1 \text{ H}_2\text{O}[\text{Cytoplasm}] + 4 \text{ HH}(+)[\text{Periplasm}]$
93	Periplasma	$2 \text{ oxidized-cytochrome-c}[\text{Cytoplasm}] + \text{UQH}_2[\text{Cytoplasm}] \Rightarrow 2 \text{ reduced-cytochrome-c}[\text{Cytoplasm}] + \text{UQ}[\text{Cytoplasm}] + 2 \text{ HH}(+)[\text{Periplasm}]$
94	Periplasma	$\text{NADH}[\text{Cytoplasm}] + \text{UQ}[\text{Cytoplasm}] + 5 \text{ HH}(+)[\text{Cytoplasm}] \Rightarrow \text{NAD}(+)[\text{Cytoplasm}] + \text{UQH}_2[\text{Cytoplasm}] + 4 \text{ HH}(+)[\text{Periplasm}]$
95	Periplasma	$\text{NADP}(+)[\text{Cytoplasm}] + \text{NADH}[\text{Cytoplasm}] + \text{HH}(+)[\text{Periplasm}] \Rightarrow \text{NADPH}[\text{Cytoplasm}] + \text{NAD}(+)[\text{Cytoplasm}] + \text{HH}(+)[\text{Cytoplasm}]$
96	Citoplasma	$\text{NAD}(+)[\text{Cytoplasm}] + \text{ATP}[\text{Cytoplasm}] \Rightarrow \text{NADP}(+)[\text{Cytoplasm}] + \text{ADP}[\text{Cytoplasm}]$
97	Periplasma	$\text{formate}[\text{Periplasm}] + 2 \text{ oxidized-cytochrome-c}[\text{Cytoplasm}] \Rightarrow \text{CO}_2[\text{Periplasm}] + 2 \text{ reduced-cytochrome-c}[\text{Cytoplasm}] + 2 \text{ HH}(+)[\text{Periplasm}]$
98	Periplasma	$\text{formaldehyde}[\text{Periplasm}] + 2 \text{ oxidized-cytochrome-c}[\text{Cytoplasm}] \Rightarrow \text{formate}[\text{Periplasm}] + 2 \text{ HH}(+)[\text{Periplasm}] + 2 \text{ reduced-cytochrome-c}[\text{Cytoplasm}]$
99	Citoplasma	$(\text{R})\text{-3-hydroxybutanoyl-CoA}[\text{Cytoplasm}] + \text{NADPH}[\text{Cytoplasm}] \Rightarrow 3\text{HB}(n)[\text{Cytoplasm}] + \text{NADP}(+)[\text{Cytoplasm}] + \text{CoA}[\text{Cytoplasm}]$
100	Citoplasma	$\text{propionyl-CoA}[\text{Cytoplasm}] + \text{acetyl-CoA}[\text{Cytoplasm}] \Rightarrow \text{ketovaleryl-CoA}[\text{Cytoplasm}] + \text{CoA}[\text{Cytoplasm}]$
101	Citoplasma	$\text{ketovaleryl-CoA}[\text{Cytoplasm}] + \text{NADPH}[\text{Cytoplasm}] \Rightarrow \text{HVCoA}[\text{Cytoplasm}] + \text{NADP}(+)[\text{Cytoplasm}]$
102	Citoplasma	$\text{HVCoA}[\text{Cytoplasm}] \Rightarrow 3\text{HV}(n)[\text{Cytoplasm}] + \text{CoA}[\text{Cytoplasm}]$
103	Citoplasma	$0.78 \text{ 3HB}(n)[\text{Cytoplasm}] + 0.13 \text{ 3HB}(n)[\text{Cytoplasm}] + 0.09 \text{ 3HB}(n)[\text{Cytoplasm}] \Rightarrow \text{PHA}(n)[\text{Cytoplasm}]$

104	Citoplasma	succinyl-CoA[Cytoplasm] + NADPH[Cytoplasm] + H(+)[Cytoplasm] <=> succinate semialdehyde[Cytoplasm] + NADP(+)[Cytoplasm]
105	Citoplasma	NADPH[Cytoplasm] + succinate semialdehyde[Cytoplasm] <=> (R)-4-hydroxybutanoyl-CoA[Cytoplasm] + NADP(+)[Cytoplasm]
106	Citoplasma	(R)-4-hydroxybutanoyl-CoA[Cytoplasm] + NADPH[Cytoplasm] => 4HB(n)[Cytoplasm] + CoA[Cytoplasm] + NADP(+)[Cytoplasm]
107	Citoplasma	(R)-4-hydroxybutanoyl-CoA[Cytoplasm] + propionyl-CoA[Cytoplasm] => (R)-4-hydroxyheptanoyl-CoA[Cytoplasm] + CoA[Cytoplasm]
108	Citoplasma	(R)-4-hydroxyheptanoyl-CoA[Cytoplasm] => 4HHep(n)[Cytoplasm] + CoA[Cytoplasm]
109	Citoplasma	(R)-4-hydroxybutanoyl-CoA[Cytoplasm] + (R)-3-hydroxybutanoyl-CoA[Cytoplasm] => (R)-4-hydroxyoctanyl-CoA[Cytoplasm] + CoA[Cytoplasm]
110	Citoplasma	(R)-4-hydroxyoctanyl-CoA[Cytoplasm] + NADPH[Cytoplasm] => 4HO(n)[Cytoplasm] + CoA[Cytoplasm] + NADP(+)[Cytoplasm]
111	Citoplasma	2 (R)-3-hydroxybutanoyl-CoA[Cytoplasm] => (R)-3-hydroxyoctanyl-CoA[Cytoplasm] + CoA[Cytoplasm]
112	Citoplasma	ketovaleryl-CoA[Cytoplasm] + propionyl-CoA[Cytoplasm] + NADPH[Cytoplasm] => (R)-3-hydroxyoctanyl-CoA[Cytoplasm] + NADP(+)[Cytoplasm] + CoA[Cytoplasm]
113	Citoplasma	(R)-3-hydroxyoctanyl-CoA[Cytoplasm] + NADPH[Cytoplasm] => 3HO(n)[Cytoplasm] + CoA[Cytoplasm] + NADP(+)[Cytoplasm]
114	Citoplasma	3HB(n)[Cytoplasm] + H2O[Cytoplasm] => 3HB(n-1)[Cytoplasm] + (R)-3-hydroxybutanoate[Cytoplasm]
115	Citoplasma	(R)-3-hydroxybutanoyl-CoA[Cytoplasm] + 3HB(n-1)[Cytoplasm] => 3HB(n)[Cytoplasm] + CoA[Cytoplasm]
116	Citoplasma	(R)-3-hydroxybutanoate[Cytoplasm] + NAD(+)[Cytoplasm] <=> acetoacetate[Cytoplasm] + NADH[Cytoplasm] + H(+)[Cytoplasm]
117	Citoplasma	3HV(n)[Cytoplasm] + H2O[Cytoplasm] => 3HV(n-1)[Cytoplasm] + hydroxyvalerate[Cytoplasm]
118	Citoplasma	HVCoA[Cytoplasm] + NADPH[Cytoplasm] + 3HV(n-1)[Cytoplasm] => 3HV(n)[Cytoplasm] + NADP(+)[Cytoplasm] + CoA[Cytoplasm]
119	Citoplasma	hydroxyvalerate[Cytoplasm] + NADP(+)[Cytoplasm] => ketovalerate[Cytoplasm] + NADPH[Cytoplasm]
120	Citoplasma	ketovalerate[Cytoplasm] => acetate[Cytoplasm] + propionate[Cytoplasm]
121	Citoplasma	3HO(n)[Cytoplasm] + H2O[Cytoplasm] => (R)-3-hydroxyoctanoate[Cytoplasm] + 3HO(n-1)[Cytoplasm]
122	Citoplasma	(R)-3-hydroxyoctanyl-CoA[Cytoplasm] + 3HO(n-1)[Cytoplasm] + NADPH[Cytoplasm] => 3HO(n)[Cytoplasm] + CoA[Cytoplasm] + NADP(+)[Cytoplasm]
123	Citoplasma	(R)-3-hydroxyoctanoate[Cytoplasm] + H2O[Cytoplasm] => 2 (R)-3-hydroxybutanoate[Cytoplasm]
124	Citoplasma	(R)-3-hydroxyoctanoate[Cytoplasm] + H2O[Cytoplasm] => ketovalerate[Cytoplasm] + propionate[Cytoplasm]
125	Citoplasma	AMP[Cytoplasm] + ATP[Cytoplasm] => 2 ADP[Cytoplasm]

126	Citoplasma	ATP[Citoplasma] => ADP[Citoplasma] + phosphate[Citoplasma]
127	Citoplasma	ATP[Citoplasma] + CoA[Citoplasma] + H(+)[Citoplasma] + acetoacetate[Citoplasma] => diphosphate[Citoplasma] + AMP[Citoplasma] + acetoacetyl-CoA[Citoplasma]

Anexo 3. Listado de enzimas.

Tabla A2-1. Enzimas.

ID	NÚMERO EC	NOMBRE
1	1.14.13.15	methane monooxygenase
2	1.1.99.8	methanol dehydrogenase
3	noEC	H4F-dependent formaldehyde activating
4	4.3.-.-	H4MPT-dependent formaldehyde activating
5	1.5.-.-	methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase 1
6	1.5.-.-	methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase 2
7	3.5.4.27	methenyltetrahydromethanopterin cyclohydrolase
8	2.3.1.101	formylmethanofuran:H4MPT formyltransferase
9	-.-.-.-	formyl-MFS hydrolysis
10	1.2.1.2	formate dehydrogenase
11	6.3.4.3	formate-tetrahydrofolate ligase
12	3.5.4.9	methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase
13	1.5.1.5	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase
14	2.1.2.1	serine hydroxymethyltransferase
15	2.6.1.45	L-serine-glyoxylate aminotransferase
16	1.1.1.29	hydroxypyruvate reductase
17	2.7.1.165	glycerate kinase
18	4.2.1.11	enolase
19	4.1.1.31	phosphoenolpyruvate carboxylase
20	1.1.1.37	malate dehydrogenase
21	6.2.1.9	malyl-CoA synthetase
22	4.1.3.24	malyl-CoA lyase
23	2.3.1.9	acetyl-CoA C-acetyltransferase
24	1.1.1.36	acetoacetyl-CoA reductase 1
25	2.8.3.5	succinyl-CoA:3-oxo-acid CoA-transferase

26	2.8.3.-	CoA-transferases
27	1.2.2.2	pyruvate dehydrogenase/oxidase
28	6.2.1.1	acetyl-CoA synthetase
29		un know
30	1.3.1.85	crotonyl-CoA reductase/carboxylase
31	1.3.1.8	crotonyl-CoA reductase
32	noEC	butyryl-CoA carboxylase
33	5.4.99.2	ethylmalonyl-CoA mutase
34	noEC	mesaconyl-CoA hydratase
35	noEC	methylsuccinyl-CoA dehydrogenase
36	noEC	b-methylmalyl-CoA lyase
37	6.4.1.3	propionyl-CoA carboxylase 1
38	5.1.99.1	methylmalonyl-CoA epimerase
39	5.4.99.2	methylmalonyl-CoA mutase
40	2.3.3.1	citrate synthase
41	4.2.1.3	aconitate hydratase
42	1.1.1.42	isocitrate dehydrogenase
43	noEC	2-oxoglutarate dehydrogenase
44	3.1.2.3	succinyl-CoA hydrolase
45	1.3.99.1	succinate dehydrogenase
46	4.2.1.2	fumarate hydratase
47	1.1.1.39	malate dehydrogenase (decarboxylating)
48	noEC	pyruvate dehydrogenase
49	4.1.1.3	oxaloacetate decarboxylase
50	6.2.1.5	succinyl-CoA synthetase
51	1.1.99.16	malate dehydrogenase, FAD/NAD(P)-binding domain
52	4.2.1.17	(R)-3-hydroxybutyryl-CoA dehydratase
53	2.7.9.1	pyruvate phosphate dikinase
54	5.1.2.3	3-hydroxyacyl-CoA epimerase (n-4:0)
55	1.1.1.35	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (n-4:0)
56	4.2.1.17	3-hydroxybutyryl-CoA dehydratase

57	noEC	propionate CoA syntase
58	noEC	methane transport via diffusion (extracellular to periplasm)
59	noEC	methanol transport
60	noEC	Citrate transport
61	noEC	Propionate transport
62	noEC	Glyoxylate transport
63	noEC	Acetate transport
64	noEC	Succinate transport
65	noEC	Fumarate transport
66	noEC	Formate transport
67	noEC	CoA
68	noEC	O2 transport via diffusion (extracellular to periplasm)
69	noEC	phosphate transport via diffusion (extracellular to periplasm)
70	noEC	HCO ₃ ⁻ [Cytoplasm]
71	noEC	phosphate ABC transporter
72	noEC	O2 transport via diffusion (periplasm to cytoplasm)
73	noEC	CO2 transport via diffusion (periplasm to cytoplasm)
74	noEC	formaldehyde transport via diffusion (periplasm to cytoplasm)
75	noEC	CO2 transport via diffusion (extracellular to periplasm)
76	noEC	OUT H2O
77	noEC	OUT H2O
78	noEC	out H ⁺
79	noEC	OUT H ⁺
80	noEC	out AMP
81	2.3.1.B6	PHA OUT
82		PHA copolymer inlet
83	1.9.3.-	cytochrome d terminal oxidase
84	-.-.-.-	ETF dehydrogenase
85	3.6.1.1	inorganic pyrophosphatase
86	1.18.1.2	NADPH-ferredoxin oxidoreductase 1
87		photosystem I cyclic

88	1.6.5.-	NADH:ubiquinone oxidoreductase II
89	3.6.1.1	H(+)-translocating pyrophosphatases
90	3.6.3.14	ATP synthase
91	1.9.3.1	cytochrome c oxidase
92	1.10.2.-	cytochrome o ubiquinol oxidase
93	1.10.2.2	ubiquinol-cytochrome c reductase
94	1.6.5.3	NADH:ubiquinone oxidoreductase I
95	1.6.1.2	NAD(P) transhydrogenase
96	2.7.1.23	NAD kinase
97	1.2.2.1	formate dehydrogenase (cytochrome-linked) periplasmic
98		formaldehyde dehydrogenase
99	2.3.1.-	poly(3-hydroxyalkanoate) polymerase
100	2.3.1.16	phosphate acetyltransferase 2
101	1.1.1.30	Hydroxybutyrate dehydrogenase
102	2.3.1.B4	Type III Polyhydroxybutyrate synthase
103	2.3.1.B5	PHA synthesis
104	1.2.1.76	succinyl-CoA reductase
105	1.1.1.n11	succinic semialdehyde reductase
106	2.3.1.B4	Type III Polyhydroxybutyrate synthase
107	2.3.1.16	phosphate acetyltransferase 2
108	2.3.1.B4	Type III Polyhydroxybutyrate synthase
109	2.3.1.16	phosphate acetyltransferase 2
110	2.3.1.B4	Type III Polyhydroxybutyrate synthase
111	2.3.1.16	phosphate acetyltransferase 2
112	1.1.1.30	Hydroxybutyrate dehydrogenase
113	2.3.1.B4	Type III Polyhydroxybutyrate synthase
114	3.1.1.22, 3.1.1.75	poly(3-hydroxyalkanoate) depolymerase
115	2.3.1.-	poly(3-hydroxyalkanoate) polymerase
116	1.1.1.30	D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase
117	3.1.1.22, 3.1.1.75	poly(3-hydroxyalkanoate) depolymerase

118	2.3.1.-	poly(3-hydroxyalkanoate) polymerase
119	1.1.1.30	D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase
120	1.1.1.30	D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase
121	3.1.1.22, 3.1.1.75	poly(3-hydroxyalkanoate) depolymerase
122	2.3.1.-	poly(3-hydroxyalkanoate) polymerase
123	1.1.1.30	D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase
124	1.1.1.30	D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase
125	noEC	AMP degradation
126	noEC	ATP degradation
127	6.2.1.16	Acetoacetate:CoA ligase (AMP-forming)

Anexo 4. Lista de publicaciones y trabajos presentados durante el desarrollo de este trabajo.

A continuación se muestra una lista de los artículos publicados y los procedings presentados en diferentes revistas y congresos internacionales donde el presente trabajo fue presentado:

- 2010 Zúñiga, C., Morales, M., S., Revah, Methane Elimination and the Synthesis of Poly- β -Hydroxybutyrate, Proceedings of the 9th Conference of Biofiltration for Air Pollution Control, September.
- 2011 Zúñiga, C., Morales, M., Le Borgne, S., Revah, S., 2011. Production of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) by *Methylobacterium organophilum* isolated from a methanotrophic consortium in a two-phase partition bioreactor. J. Hazard. Mat. 190, 876-882.
- 2013 Zúñiga, C., Morales, M., S., Revah, S., 2013. Polyhydroxyalkanoates accumulation by *Methylobacterium organophilum* CZ-2 during methane degradation using citrate or propionate as cosubstrates. Bioresour. Technol. 129, 686-689.
- 2013 Zúñiga, C., Morales, M., S., Revah. Methane elimination and synthesis of PHAs by *Methylobacterium organophilum* CZ-2 using cosubstrates. Proceedings of the 5th IWA Conference on Odors and Air Emissions Jointly held with the 10th Conference on Biofiltration for Air Pollution Control, March.

Participación en congresos:

- 2009 XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. SMBB. Microorganismos metanotróficos en la síntesis de polímeros biodegradables (PHB). Acapulco, Guerrero.
- 2010 Sociedad Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal, SOLABIA. Productos biotecnológicos a partir de gases invernadero. Cancun, México.
- 2013 System biology conference. SILS, System Biology Infrastructure for the Life Sciences. GEMM of the methanotrophic metabolism of *Methylobacterium organophilum* CZ-2 in the synthesis of polyhydroxyalkanoates. Örsundsbro, Sweden.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA


No. 00126

Matrícula: 207381645

ESTUDIO DE LA DEGRADACION DE METANO Y ACUMULACION DE POLIMEROS INTRACELULARES POR *Methyobacterium organophilum* CZ-2

En México, D.F., se presentaron a las 11:00 horas del día 28 del mes de enero del año 2014 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. JUAN SILVESTRE ARANDA BARRADAS
- DR. ROBERTO OLIVARES HERNANDEZ
- DR. LUCIANO AGUILERA VAZQUEZ
- DR. OSCAR ARMANDO MONROY HERMOSILLO



Nancy Zuñiga

NANCY CRISTAL ZUÑIGA PEÑA
ALUMNA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN BIOTECNOLOGIA
DE: NANCY CRISTAL ZUÑIGA PEÑA

REVISÓ

Julio Cesar de Lara Isassi

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

Edith Ponce Alquicira

RA. EDITH PONCE ALQUICIRA

PRESIDENTE

Juan Silvestre Aranda Barradas

DR. JUAN SILVESTRE ARANDA BARRADAS

VOCAL

Roberto Olivares Hernandez

DR. ROBERTO OLIVARES HERNANDEZ

VOCAL

Luciano Aguilera Vazquez

DR. LUCIANO AGUILERA VAZQUEZ

SECRETARIO

Oscar Armando Monroy Hermosillo

DR. OSCAR ARMANDO MONROY HERMOSILLO