

El metabolismo estructurado de **Gluconacetobacter entanii**

Modelamiento y experimentación.

TESIS

que para optar por el grado de
Doctor en Ciencias (Ingeniería Química)
presenta

Hugo Alberto Velasco Bedrán

Asesor

Dr. Felipe López Isunza.

**Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa.
2007**

Es una convención común de nuestra cultura atribuir algún avance en el desarrollo del conocimiento a un individuo en particular. Nada hay más falso. El conocimiento es en su origen una construcción colectiva que sólo tiene sentido por su uso, su expresión, sociales.

Este es el resultado de un trabajo de un equipo al que me honro en pertenecer. La tribu de los biotecnólogos me formó e impulsó a iniciar este camino. Me han nutrido y alentado sus asentamientos en Popotla, Toluca, Iztapalapa, Cuernavaca, Copilco, Londres y Lyngby.

Gracias a la inspiración de Carlos Casas Campillo, Yoloxóchitl Bustamante, Próspero Genina, Teodoro Santiago, Luis Gilberto Torres, Octavio Paredes, Heberto Castillo, Felipe López, Uriel Aréchiga y John Villadsen. Agradecimientos a la sabiduría de Gretchen Lapidus, Jesús Alberto Ochoa, María Teresa Ramírez, Sergio Revah y Alberto Soria. Gratitud para la generosa camaradería de Mariano Rojas, Ernesto Favela, Gustavo Fidel Gutiérrez, Guadalupe Inei, Nora Ruiz, Carmen Ramírez, Margarita González, Sergio Huerta, Juvencio Galíndez, Celia Araujo, Víctor Hugo Valtierra, Omar Castillo, Inés y Nohemí Montiel. Los momentos de camaradería en el Laboratorio con Eduardo Razo C., Nelly Rodríguez C., Hugo C. González H., Marco Tulio Fernández, Priscila Ortega S., Ricardo Lazcano F. y Edgar Montes H. han sido de aprendizaje no sólo de la bioingeniería; gracias a todos.

Sin la paciencia, la comprensión y el apoyo inflaqueable de Marina Martha Ferrer, Thalía y Beatriz Velasco y Alejandra González, no podría estar escribiendo este texto preliminar.

RESUMEN

Un cultivo de vinagre doméstico fue muestreado y se aisló una bacteria capaz de oxidar el etanol y la glucosa a ácido acético y de producir celulosa y un polisacárido hidrofílico. El cultivo es estrictamente aeróbico, tolerante a pHs ácidos (~ 3.5) y con temperatura óptima de crecimiento de 30°C. Una muestra de DNA se empleó para amplificar el gen 16S rRNA, cuya secuencia muestra una similitud de 99.89% con la de *Gluconacetobacter entanii* (*Ga. entanii*).

Se realizaron experimentos en procesos por lote y continuos, en medios de diferente composición: con sacarosa y etanol, sólo etanol o sólo sacarosa; y en todos los casos en presencia de ácido acético. Los procesos continuos se realizaron a diversas tasas de dilución, encontrando que en todos los casos se produjo celulosa y un polímero, presumiblemente el acetán.

La bioquímica publicada de *Acetobacter xylinum* (o *Gluconacetobacter xylinus*) se empleó como una base razonable para explicar los resultados experimentales hallados, debido a la escasa información sobre la bioquímica de *Ga. entanii* (cuya identificación es reciente, Schüller y col., 2000).

Con el enfoque de estado estacionario para la concentración de los metabolitos intracelulares se desarrolló un modelo estequiométrico simple que integra por primera vez las rutas catabólicas de la sacarosa, el etanol y el ácido acético, con las rutas centrales del metabolismo, activas en este género, y con la biosíntesis de la celulosa y un polímero hidrofílico. Este modelo cuenta con el detalle suficiente para describir la complejidad de las rutas metabólicas y fue empleado para analizar nuestros resultados experimentales así como los de otros investigadores. En particular el modelo permite describir cualitativamente el comportamiento de algunos metabolitos intracelulares clave.

Se presenta por primera vez el comportamiento de la red metabólica de *Gluconacetobacter entanii*, mostrando experimentalmente las ligas internas entre las rutas metabólicas de consumo de etanol y de glucosa y fructosa, y la producción de todos los metabolitos terminales de *Gluconacetobacter entanii* (biomasa, celulosa, ácido acético, y acetán) cuando la fuente de carbono es sólo etanol; sólo glucosa y fructosa, o una mezcla de éstos.

INDICE

I.- INTRODUCCIÓN	1
I.1 Modelos del crecimiento celular	5
no estructurado	5
estructurado	7
I.2 Motivación de este trabajo	
II.- EL METABOLISMO DE <u>Gluconacetobacter</u> spp EN LA LITERATURA ACTUAL	10
II.1 El metabolismo de <u>Gluconacetobacter</u> spp	10
II.2 El metabolismo de <u>Gluconacetobacter xylinus</u>	10
III.- OBJETIVOS	19
IV.- MATERIALES Y MÉTODOS	20
IV.1 Sistema experimental	20
IV.2 El microorganismo	20
IV.3 Métodos analíticos	24
IV.4 El bio-reactor y su caracterización	27
V.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
V.1 El Modelamiento	31
IV.1.1 El Modelamiento del sistema de biorreacción	31
IV.1.2 El Modelamiento del metabolismo de <u>Gluconacetobacter entanii</u>	33
V.2 Resultados Experimentales	43
IV.2.1 de la identificación del microorganismo	43
IV.2.2. de los experimentos en estado estacionario	44
IV.2.2 de los experimentos en proceso por lote	60

VI.- CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	65
VII.- BIBLIOGRAFÍA	67
VIII.- APÉNDICES	
VIII.1. Las secuencias de las bases nucleotídicas en el gen 16S rRNA del microorganismo estudiado.	73
VIII.2. Sobre la expresión cinética del consumo de sustratos.	84
VIII.3. El modelamiento y caracterización del biorreactor empleado	86
VIII.4. Comunicación científica publicada en “Process Biochemistry” (2007) “The unified metabolism of <i>Gluconacetobacter entanii</i> in continuous and batch processes”	92

I. - Introducción.

“Current knowledge of biochemical systems is composed of a vast set of data that accumulates at an increasing rate. Advances in analytical methods and development of sophisticated instrumentation have provided the tools that allow us to know more than we can understand”

Hatzimanitakis, V.; Emmerling, M.; Sauer, U and Bailey, J. (1998)
Biotechnology and Bioengineering, **58** (2,3): 154-161.

La observación en el epígrafe de Hatzimanitakis y colaboradores, sobre la enorme masa de conocimientos de la química de los seres vivos, y su acelerada acumulación, es válida diez años después. Un uso más eficiente de ese cúmulo para aplicaciones prácticas se logra mediante el uso de modelos, porque el manejo de esa información es entonces susceptible a las técnicas matemáticas que permiten pasar de los numerosos detalles a generalizaciones más sucintas. Los modelos del metabolismo y del crecimiento microbianos son una herramienta indispensable para construir el entendimiento a partir del conocimiento (Bellgardt, 2000; Torres y Voit, 2002).

El trabajo que se presenta aborda el metabolismo de *Gluconacetobacter entanii*, una bacteria aerobia recientemente identificada (Schüller y col., 2000) que crece sobre sacarosa, fructosa, glucosa, etanol y ácido acético como fuentes de carbono y con consumo obligado de oxígeno, produciendo ácido acético, celulosa, un polímero hidrofílico, presumiblemente el acetán (Kornmann y col., 2003a) y la biomasa



Figura 1.- Crecimiento de *Gluconacetobacter entanii* en cultivo sin agitación, en una biopelícula, junto a una escala (cada cuadro mide 1 cm).

El microorganismo, con los últimos tres productos mencionados, forma una biopelícula. En cultivos sin agitación la biopelícula crece en la superficie del medio líquido, recibiendo el oxígeno de la capa de aire en la parte superior del recipiente y las fuentes de carbono del medio líquido (ver Figura 1). De la observación de la figura 1 y tratándose de una bacteria estrictamente aerobia, se puede concluir que de todo el espacio en el recipiente, sólo el que ocupa la biopelícula es reactivo. Un enfoque más cercano hará percatarnos de que, en una biopelícula, el sitio de la reacción es el ocupado por las células. Aún más, lo que sabemos hoy de la bioquímica microbiana nos señala que la célula podría describirse como una red interconectada de sitios de biorreacción. Este abanico de enfoques es empleado para analizar lo que sucede en un reactor de laboratorio, su influencia en la composición celular del microorganismo modelo así como en la composición macroscópica del medio de cultivo.

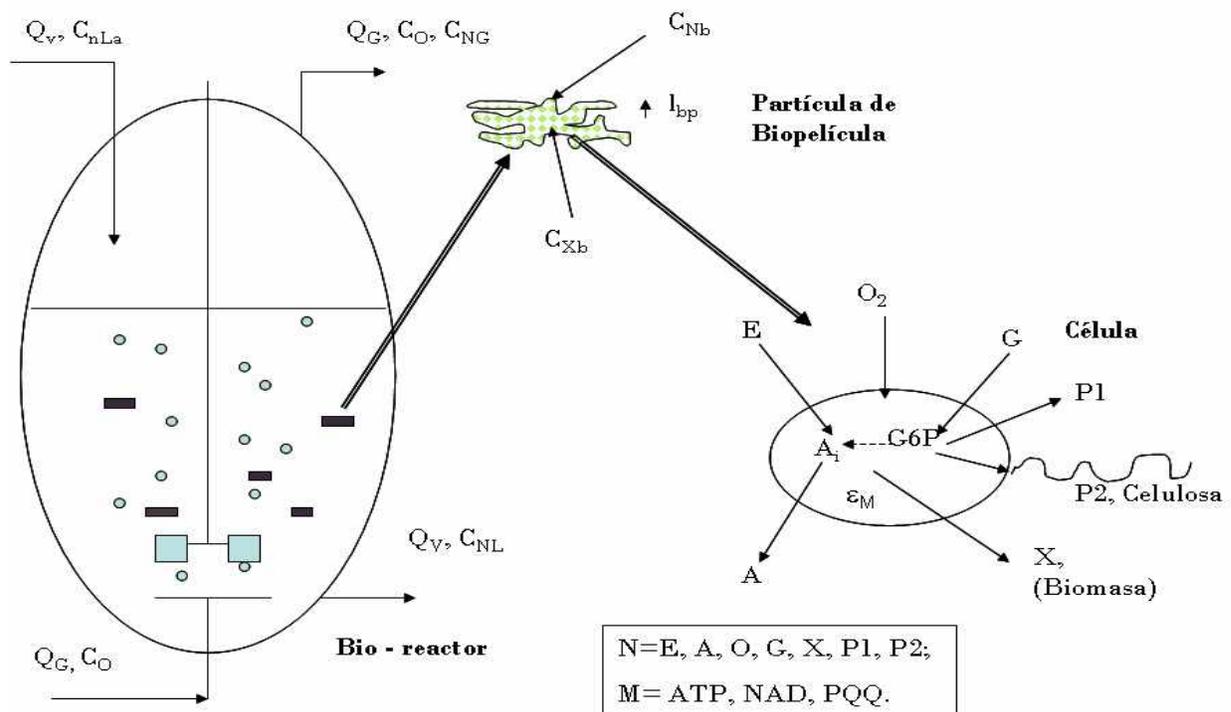


Figura 2.- Modelo del biorreactor y los enfoques considerados. **C** simboliza la concentración en el medio líquido y ϵ la concentración intracelular. El subíndice **L** se refiere a la fase líquida en el reactor, **G** al gas y **b** a la biopelícula. Las células se encuentran dispersas en la biopelícula. Las especies químicas mostradas son E, etanol; A, ácido acético; O, oxígeno; G, glucosa; X, biomasa; P1, el polímero hidrofílico y P2, celulosa. ATP es el adenosín trifosfato, NAD es el nicotín adenosin dinucleótido y PQQ la pirrolo quinolín quinona. Q_v y Q_G son los flujos de medio y aire respectivamente. La partícula de biopelícula tiene un grosor l_{bp} .

En la Figura 2 esquemáticamente se muestran los niveles de nuestro enfoque: el biorreactor con medio líquido en el cual crece la biopelícula, no en la superficie, sino como flóculos en suspensión. Dentro de éstos se encuentran dispersas las células bacterianas y los sustratos del medio líquido llegan a la célula mediante un transporte difusivo. Los cambios en algunos de los metabolitos intracelulares clave son medidos en este trabajo.

Gluconacetobacter spp. es un género no sólo interesante por los variados rasgos de su bioquímica, sino asimismo por que éstos se proyectan en distintos campos de la biotecnología. La producción mundial de vinagre es una industria sólida con un mercado amplio. Por ejemplo, en México, pese al cierre de muchas plantas de fermentaciones en la última década del siglo, se mantiene en operación una planta productora de vinagre asociada a la industria de conservas alimenticias. Al sostenido interés por la producción de la celulosa bacteriana, se aúna el creciente interés por la biosíntesis de polímeros hidrofílicos también de interés en la industria alimentaria. Finalmente, su impacto como fijador de nitrógeno lo perfila como de interés para los agrobiótecnólogos.

La celulosa producida por *Gluconacetobacter* spp. tiene una calidad singular, pues no está acompañada de lignina como la de origen vegetal, y es por ende más pura. La cristalinidad de sus fibras es alta y posee una resistencia tensil mayor que la celulosa de origen vegetal. Esto ha hecho que sea un material apreciado para aplicaciones finas (Nakagaito y col., 2005). Una segunda característica es su alta retención de agua, lo que la hace idónea para ser empleada como promotora de la cicatrización en el tratamiento de quemaduras cutáneas (Czaja y col., 2007).

El género produce asimismo polisacáridos hidrofílicos que se unen a la celulosa formando una matriz compacta y de densidad menor que la del agua. Estos polímeros tienen interés desde el punto de vista del procesamiento de alimentos. El polímero producido por *Gluconacetobacter xylinus*, (el acetán), es objeto de una patente (Duboc y otros, 2002).

Gluconacetobacter entanii al producir la celulosa la extrude fuera de la célula pero no se desprende de ella, por ello sólo una cepa carente de la capacidad de síntesis de celulosa puede crecer como células libres. Nuestro interés es entender su metabolismo completo y, como parte de un esfuerzo más amplio y en proceso, nuestro trabajo en la forma presente se circunscribe al estudio del metabolismo de *Gluconacetobacter entanii*.

En el esquema de la Figura 3 se muestra a la célula como una caja negra. Se señala que consume tres sustratos y produce biomasa, ácido acético, celulosa y acetán. La producción de H₂O no es considerada, considerando que se encuentra en un medio acuoso. Los modelos prevalecientes

del crecimiento de la biopelícula consideran que el crecimiento de ésta es función de la producción de los polímeros extracelulares (y éstos del crecimiento microbiano).

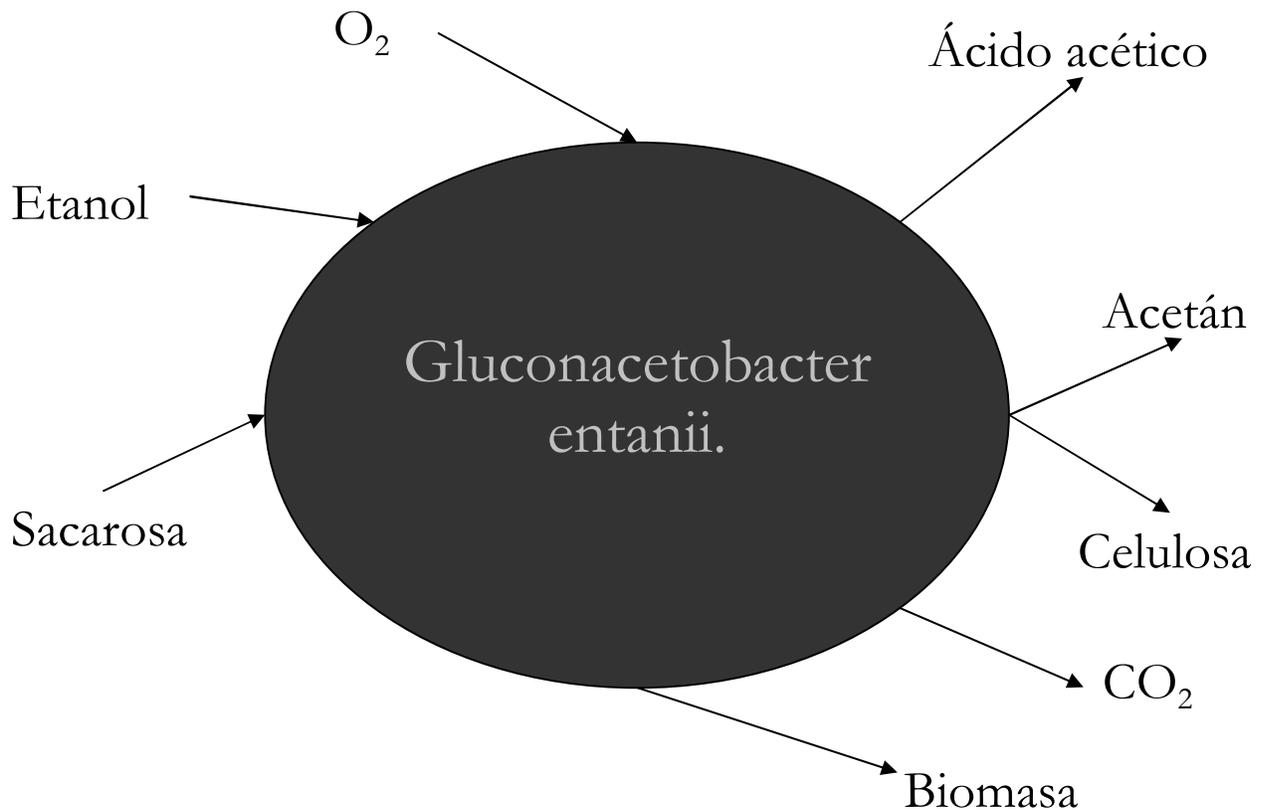


Figura 3.- Esquema de "caja negra" para el metabolismo de *Gluconacetobacter entanii*.

El problema que se aborda consiste en trascender el enfoque de caja negra, utilizando el conocimiento existente de la bioquímica de este género para estructurar un diagrama de la red del metabolismo íntegro del microorganismo estudiado y simplificarlo agrupando las reacciones consideradas, dada la complejidad de la bioquímica del microorganismo que se estudia.

Se concluye esta introducción con una revisión del estado actual de los modelos de crecimiento microbiano.

El siguiente capítulo incluye una revisión del estado actual de la taxonomía de las bacterias acéticas, así como de la bioquímica genérica de *Gluconacetobacter* (*Ga*) y específicamente de *Ga. xylinus*.

Un tercer capítulo muestra las motivaciones de este trabajo y sus objetivos.

Los métodos, equipo y materiales empleados son descritos en un cuarto capítulo.

El capítulo quinto muestra los resultados y su discusión, seguido por las conclusiones que integran el capítulo sexto. La literatura citada se enlista en el séptimo capítulo.

Se anexa, finalmente, como apéndices alguna información que soporta los resultados que se han discutido.

I.1.- Modelos del crecimiento celular.

Modelos no estructurados.

Hace más de medio siglo, el microbiólogo francés Jacques Monod (1949) sistematizó las mediciones de numerosos investigadores previos así como sus propias mediciones experimentales sobre el crecimiento bacteriano y propuso dos generalizaciones empíricas:

a) la cantidad de crecimiento de un microorganismo sobre un sustrato es proporcional al sustrato consumido;

$$K = \frac{C}{S} \quad (1)$$

según la notación original de Monod, (Monod, 1949) K es el coeficiente estequiométrico (“rendimiento”) biomasa / sustrato, C es la “masa de crecimiento” y S es la masa de sustrato consumido,

b) la velocidad específica del crecimiento microbiano es proporcional a una cinética de saturación respecto al sustrato limitante, matemáticamente igual a la cinética enzimática descrita por Leonor Michaelis y Maude Menten en 1913. Siguiendo la misma notación: R es la velocidad específica de crecimiento, R_{max} es la constante de la bio – reacción de crecimiento, C_S y K son las concentraciones de sustrato y de “afinidad” o saturación del mismo sustrato. De esta manera se sentó las bases para sistematizar la estequiometría y la cinética de las bio – reacciones.

$$R = \frac{R_{max} C_S}{K + C_S} \quad (2).$$

La expresión (2) describe el comportamiento de prácticamente todas las poblaciones microbianas en las condiciones fijadas por Monod, en cuanto a su naturaleza autocatalítica, y al doble comportamiento frente a **un** sustrato limitante: a altas concentraciones del sustrato la velocidad de crecimiento microbiano es de orden cero, pero a bajas concentraciones muestra una dependencia lineal de la concentración del sustrato. Pese a que la forma de la expresión de Monod es matemáticamente idéntica a la expresión de cinética de las reacciones enzimáticas de Michaelis y Menten, hay una diferencia radical. Ésta última describe el mecanismo de reacción postulando la formación de un complejo enzima-sustrato, y define la máxima velocidad de reacción enzimática en función de la máxima concentración de enzima presente y de la constante de velocidad de la reacción más lenta en ese mecanismo. La constante de concentración relaciona las constantes de las velocidades de las reacciones elementales consideradas. No hay tal en la expresión de cinética microbiana (la ecuación 2), cuyos parámetros son completamente empíricos.

La expresión 2 ha sido empleada para describir la cinética de consumo del sustrato limitante, en términos de la ecuación 1. Monod observó que R_{max} y K son constantes para un sustrato y un microorganismo dados. La definición original de Monod está planteada en términos de incrementos o decrementos (de masa microbiana o de sustrato, respectivamente).

Estas observaciones han sido revisadas al describirse los rendimientos como relaciones entre tasas (tasa de crecimiento/tasa de consumo de sustrato), tanto por el hecho de que la linealidad de la tasa de consumo de sustrato respecto a la de crecimiento, tienen como límite una tasa de consumo de sustrato (“de mantenimiento”) a tasas de crecimiento mínimas (Herbert, 1960; Pirt, 1973), como en cuanto a que la observación de Monod se realizó en experimentos en quimiostato (esto es: en estado estacionario, con una esquema metabólico estable), lo cual no se sostiene para condiciones cambiantes, como las que se presentan en un proceso por lote (o en un bioproceso en flujo tapón).

La ecuación 2, además, no predice los efectos de inhibición por sustrato o por producto y está limitada a describir la cinética en términos de un solo sustrato limitante, lo que es una situación limitada a las condiciones de laboratorio y distinta a las que prevalecen en el medio ambiente (Kovarova-Kovar y Egli, 1998). Se han propuesto diversas modificaciones a la ecuación 2 para describir la inhibición por producto (Bazua y Wilke, 1977) o por sustrato (Thatipamala y col., 1992), así como el uso de una doble funcionalidad de Monod. Macías y col. (1996) muestran un ejemplo para modelar la bio – síntesis de ácido acético a partir de etanol.

$$\mu = \mu_{\max} \frac{C_E}{C_E + K_{SE} + \left(\frac{C_E}{K_{IE}}\right)^2} \frac{1 + \frac{C_A}{K_{SA}} \frac{C_O}{K_{SO}}}{1 + \left(\frac{C_A}{K_{IA}}\right)^3 \left(\frac{C_O}{K_{IO}}\right)^3} \quad (3)$$

C, simboliza las concentraciones y K las constantes de saturación (S) o inhibición (I), para E, etanol, A, ácido acético y O, oxígeno. Ciertamente es esperable que una expresión cinética con siete parámetros se ajuste bien a los datos experimentales.

La ecuación 3 parece mostrar los límites a los que se puede llegar en la modificación a la ecuación 2. La ecuación emplea una triple funcionalidad de Monod, con términos de inhibición por sustrato y por producto. Para describir el metabolismo de nuestro interés se requeriría además describir la cinética del crecimiento con respecto a las hexosas (glucosa y fructosa). Resulta difícil pensar en una cuádruple funcionalidad de Monod. De aquí, la necesidad de emplear modelos estructurados.

Modelos estructurados.

El modelamiento actual de los biorreactores hace énfasis en la heterogeneidad inherente de la distribución de material en los grandes reactores de cultivo sumergido (Lubbert, 2000, Reuss, 2001). Las células que crecen en estos biorreactores experimentarán entornos diferentes de una manera aleatoria. Un caso extremo de heterogeneidad del medio es el del bio – reactor de estado sólido. Para modelar la respuesta de la población celular en estas condiciones, los modelos estructurados simples ofrecen una alternativa a los modelos no estructurados, de “caja negra”, como el de Monod, en los que la biomasa se caracteriza sólo por su cantidad.

Los modelos de la estructura de la biomasa se enfocan en dos vertientes: estructuración de la población (por edad o morfología, Nielsen, 1994) o estructura de la célula en su interior.

Si bien se han presentado modelos detallados de la célula, el número de parámetros necesarios para su descripción conduce a problemas experimentales grandes para su resolución. Un modelo celular de estructura simple sirve mejor al objetivo del trabajo que se discute.

Los modelos estructurados simples han sido revisados en las dos décadas pasadas (Roels, 1983; Nielsen y Villadsen, 1992; Bellgardt, 2000, Nielsen y col., 2003). Se pueden considerar como

extensiones de los modelos no estructurados en los cuales la población celular y su composición pertinente se describen por hasta cinco parámetros que puedan ser medidos experimentalmente. Los modelos estructurados simples consideran que la composición de la biomasa puede agruparse en dos compartimentos empíricamente definidos con funciones diferenciadas (por ejemplo, maquinaria celular y estructura celular, o compartimentos “activos” e “inactivos”). De una manera general pueden separarse en modelos *mecanísticos* y *cibernéticos*.

Los primeros hacen énfasis en las reacciones enzimáticas y las rutas metabólicas. Éstas últimas se agrupan en unos pocos compartimentos, y la masa celular se considera como la suma total de los compartimentos, cada uno de los cuales se describe según su estequiometría “agrupada” y por su cinética (empírica). Los modelos simples pueden ser resueltos mediante el enfoque del estado estacionario de los metabolitos intracelulares, esto es: el funcionamiento del metabolismo en estado cuasi-estacionario.

Los modelos cibernéticos emplean un enfoque teleonómico: las células se conciben como estrategias óptimas y el crecimiento se describe mediante la estequiometría agrupada, un criterio cibernético (lógico) y la cinética (empírica). Los modelos cibernéticos permiten describir los mecanismos de control genético y no están restringidos a la consideración del estado estacionario de los metabolitos intracelulares. Por ende, pueden describir los fenómenos dinámicos del metabolismo.

El modelamiento de la célula recientemente ha tenido un desarrollo a partir del concepto de la biología de sistemas (Moxley y col., 2004, y Schaefer y Futran, 2004). La tradición de realizar experimentos sobre una hipótesis (aislando el sistema experimental alrededor de un gen, una enzima y algunos sustratos o metabolitos) ha recibido el impulso de las nuevas técnicas analíticas y de procesamiento de información que permiten obtener con rapidez numerosos datos, ha conducido al nuevo enfoque sistemático, que busca integrar las interacciones entre diversos tipos de moléculas intracelulares (así como de las moléculas de un mismo tipo entre sí).

Este enfoque intenta modelar el flujo de *masa, energía e información* entre los siguientes tipos de moléculas:

los ácidos desoxiribonucleicos y ribonucleicos que materializan la información genética, lo que se conoce como **genoma**;

las moléculas de esta misma especie de menor tamaño y que forman el tRNA y rRNA, que portan la información genética, conocidos genéricamente como el **transcriptoma**;

las proteínas cuya estructura está codificada en el transcriptoma y cuya actividad catalítica es específica que constituyen las enzimas así como otras proteínas con otras funciones, colectivamente denominadas **proteoma**, y

las pequeñas y medianas moléculas que son el sustrato o el producto de las enzimas y que materializan el flujo de masa y energía del metabolismo celular y que integran el **metaboloma**.

Las concentraciones de ciertos metabolitos constituyen señales que portan información que se procesa en el **genoma** y en el **transcriptoma**, ocasionando cambios en el **proteoma** y, por consecuencia, una composición diferente en el **metaboloma**.

II.- Estado actual de la taxonomía y la bioquímica de *Gluconacetobacter* spp.

II.1 La taxonomía de las bacterias acéticas

Las bacterias que producen ácido acético por la oxidación parcial del etanol fueron estudiadas por Pasteur en 1885. La presencia de bacterias formadoras de ácido acético, capaces de crecer sobre glucosa formando una película gruesa en la parte superior de cultivos estáticos, fue observada por Hansen y Jorgensen en 1943.

Hace quince años se reconocía dos géneros para las bacterias del ácido acético: *Acetobacter* Beijerinck, 1898 y *Gluconobacter* Asai, 1935 (Swings, 1992). En 1989 Urakami y col. describieron una especie capaz de oxidar el metanol y propusieron al género *Acidomonas* para clasificarla, en tanto que Yamada y col. (2000) propusieron transferir varias cepas previamente clasificadas como *Acetobacter* así como varias nuevas especies a un nuevo género nombrado *Gluconacetobacter*. Finalmente Lisdiyanti y col. (2002) describieron varias nuevas especies de bacterias acéticas y propusieron el género *Kozakia* para su taxonomía. El establecimiento de estos tres últimos géneros se basó en la nueva información filogenética disponible con el análisis de secuencias de bases nucleotídicas en los genes 16S. Previamente Caggia y Giudici (1996) delinearon las dificultades para la taxonomía de las bacterias acéticas y Trcek y Teuber (2002) hicieron énfasis en los problemas para clasificar a las cepas sólo sobre la base de las características fenotípicas, (por ejemplo la presencia de mutantes espontáneas no productoras de celulosa con *Gluconacetobacter xylinus*). Estos últimos autores, Schüller y col. (2000), y Franke-Whittle y col (2005) proponen nuevos árboles filogenéticos para la familia *Acetobacteraceae*, basados en las similitudes en las secuencias de los genes 16S y en el comportamiento bioquímico.

De esta familia, *Gluconacetobacter* es el género más numeroso, y muestra la mayor variedad de capacidades fisiológicas como:

- producción de ácidos orgánicos,
- fijación de nitrógeno,
- síntesis de polímeros de carbohidratos,
- entre otras.

Los habitats para estas especies incluyen frutas, zumos y soluciones alcohólicas, el comensalismo con insectos así como la simbiosis con especies vegetales (Franke-Whittle y col., 2005; Lisdiyanti y col., 2002; Yamada y col., 2000).

II.2. El metabolismo de Gluconacetobacter spp.

La búsqueda bibliográfica sobre la familia *Acetobacteraceae*, mostró la diversidad metabólica de estas bacterias en cuanto a la variedad de fuentes de carbono sobre las que pueden crecer y la diversidad de metabolitos terminales que bio sintetizan, *aparejada a la similitud de las vías centrales de su metabolismo*; a saber:

oxidación periplásmica de alcoholes o poli alcoholes por la presencia de quino proteínas con actividad de óxido-reducción;

ciclo de Krebs incompleto operando a través de la desviación del glioxilato;

gluconeogenesis a partir de piruvato proveniente del oxaloacetato del ciclo de Krebs;

presencia del ciclo de las fosfoacetato- y fosfoaldolasas;

carencia de fosfohexocinasa y la consecuente ausencia de la ruta de Embden-Meyerhof-Parnas;

desasimilación de la glucosa a través de la ruta de la pentosa fosfato;

habilidad de polimerizar hexosas hacia celulosa y otros polímeros hidrofílicos.

El metabolismo de las especies de interés industrial (*Acetobacter aceti*, *Gluconacetobacter europaeus*, *Gluconacetobacter hansenii*, y *Gluconacetobacter xylinus*, entre otras) ha sido estudiado y la descripción de sus variadas capacidades metabólicas está dispersa en comunicaciones durante sesenta años en numerosas revistas científicas, pero se tiene muy escasa información respecto al metabolismo de las especies más recientemente clasificadas. Aún más, la información sobre la bioquímica de *Gluconoacetobacter* spp. se enfoca sobre la parte directamente involucrada con el metabolito de interés (ácido acético, nitrógeno reducido, celulosa, oxidaciones parciales, etc.).

Sin embargo, es aparente que varios rasgos bioquímicos son compartidos por diferentes miembros del género y aún de la familia, por ejemplo:

la formación de una película compuesta de celulosa (Jansson y col., 1993; Toda y col., 1997), para *Gluconacetobacter xylinus*; (Yong Jung y col., 2005); para *Gluconacetobacter hansenii*; y este trabajo para *Gluconacetobacter entanii*),

la formación de una película compuesta por polisacáridos hidrofílicos (Kornmann y col., 2003a), para *Gluconacetobacter. xylinus*; (Fuentes-Ramírez y col., 2001) para *Gluconacetobacter diazotrophicus*; (Deeraksa y col., 2002) para *A. tropicalis*; (Moonmangmee y col., 2005), para *Acetobacter* spp y este trabajo para *Gluconacetobacter entanii*;

pérdida espontánea de la capacidad de formar celulosa (Krystynowicz y col., 2005) para *A. (Gluconacetobacter) xylinus*; (Yong Jung y col., 2005), para *Gluconacetobacter hansenii*; (Schüller y col., 2000) identifica a *Gluconacetobacter entanii* e informa la carencia de producción de celulosa en un fermentador industrial y nosotros encontramos que esta especie produce celulosa;

prevalencia de la oxidación parcial de etanol, dioles y azúcares.

Todo ello sugiere que las especies de este género comparten las rutas centrales del metabolismo.

Consideramos que algunos de los informes en la literatura sobre *A. xylinum (Gluconacetobacter xylinus)* pueden haber sido realizados respecto a taxa que sólo en los últimos años han sido reclasificados, además de que los árboles filogenéticos más recientemente publicados (Fuentes Ramírez y col., 2001; Schüller y col., 2000), muestran una gran cercanía genética. Por ello y ante la carencia de información sobre el metabolismo de *Gluconacetobacter entanii*, usaremos la información existente sobre *Acetobacter xylinum (Gluconacetobacter xylinus)* como representativa del metabolismo del microorganismo objeto de este estudio.

II.3 El metabolismo de Gluconacetobacter xylinus.

A continuación se describe las principales rutas catabólicas de *Gluconacetobacter xylinus* y su relación con las rutas del metabolismo central de este microorganismo. También se describe las rutas de síntesis del acetán y de la celulosa y se discute el metabolismo energético.

Catabolismo del Etanol.

Como se esquematiza en la Figura 4, el etanol es transportado activamente al interior de la célula mediante su oxidación por la alcoholdehidrogenasa (*ADH1*), una quinoproteína situada en la membrana celular. El grupo prostético de esta enzima es la pirroloquinolín-quinona (PQQ) que se reduce (PQQH₂) al oxidar el etanol a acetaldehído. Una segunda oxidación por una enzima muy semejante (la aldehído-deshidrogenasa, *ADH2*, que también tiene como cofactor a la PQQ) oxida el acetaldehído a ácido acético en el periplasma (Matsushita y col., 1992).

Parte del ácido acético es liberado al medio circundante, pero parte alimenta al reservorio del acetato intracelular, el cual tiene dos rutas: puede ser excretado al medio circundante (Matsushita y

col.; 2005) o puede ser esterificado con el ATP, lo que conduce a la síntesis de acetil-Coenzima A (Wolfe, 2005).

La acetil-Coenzima A es el compuesto que da entrada al Ciclo de los Ácidos Tricarboxílicos (CAT), que es una ruta metabólica que permite la síntesis de varios de los doce compuestos precursores comunes del anabolismo celular que se mencionarán en el apartado correspondiente.

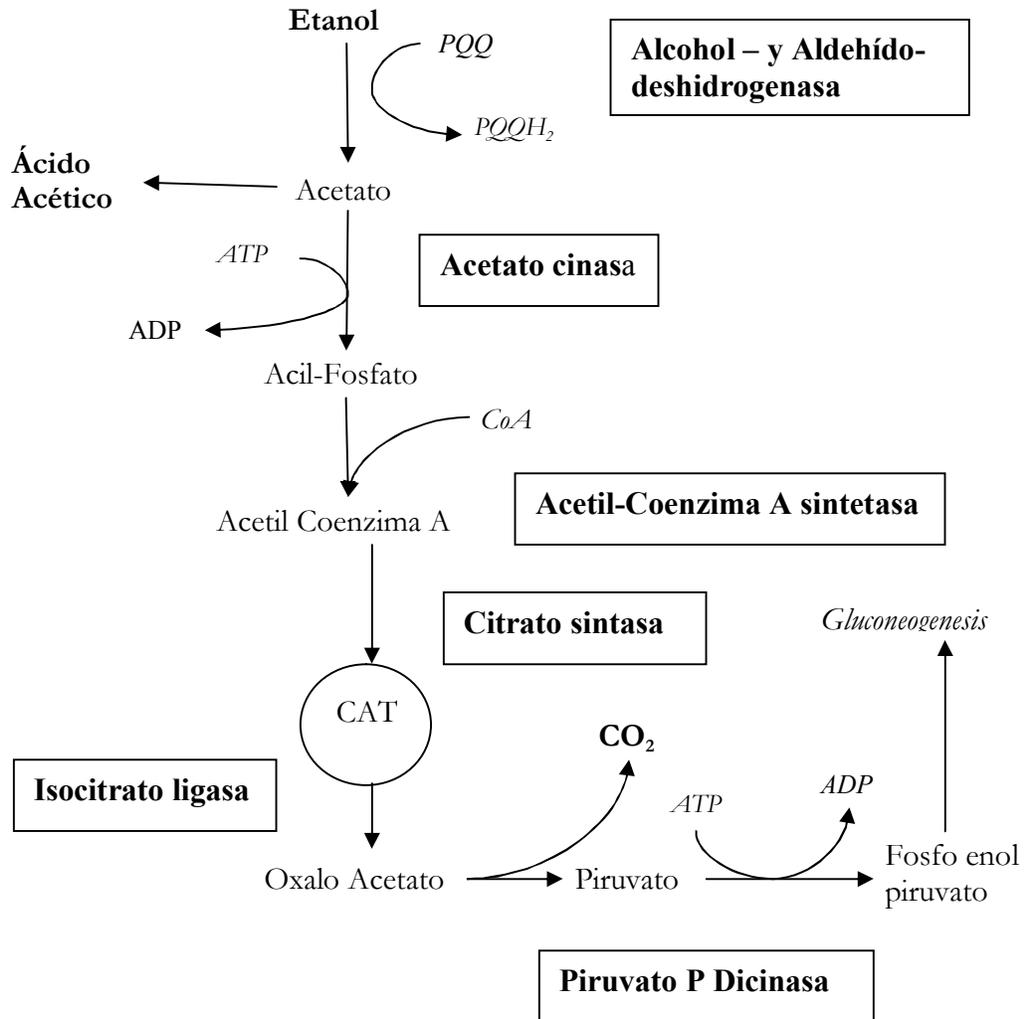


Figura 4.- Esquema del catabolismo del etanol y de sus ligas con el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (por la desviación del glioxilato) y con la gluconeogénesis en *Gluconacetobacter* spp. Se incluyen algunas de las enzimas clave. *CoA* simboliza la Coenzima A, y CAT representa la cadena cíclica de reacciones de los ácidos tricarboxílicos. Los demás símbolos como en el cuerpo del texto.

Las bacterias acéticas carecen de la enzima succinato-deshidrogenasa constitutiva (lo que explica su incapacidad para mineralizar al acetato), y la dotación de isocitrato-ligasa regula que el **CAT** opere a través de la desviación del glioxilato con producción de oxalo-acetato. (Wolfe, 2005). Éste es descarboxilado a piruvato, y el piruvato reacciona con el ATP, formando fosfo-enol piruvato (PEP). Con producción de NADH y consumo de ATP, éste último se oxida a 3-fosfo glicerato, precursor de la Gluconeogenesis.

Catabolismo de la sacarosa, la fructosa y la glucosa.

El microorganismo puede catabolizar a la sacarosa, la glucosa y la fructosa. La sacarosa es hidrolizada en el periplasma a glucosa y fructosa, como se muestra en la Figura 5. La glucosa es transportada activamente por una fosfohexocinasa (*HPK* por su nombre en inglés), con formación paralela de la glucosa 6-fosfato (G6P) y consumo de una molécula de ATP. La fructosa es incorporada a la célula mediante la inducción del complejo enzimático “sistema de la fosfo transferasa” (*PTS*), que conjuga a la fructosa que cruza la membrana celular con el fosfo enol-piruvato (PEP), fosforilando la hexosa a fructosa 6-fosfato (F6P) con formación de piruvato (Benziman y Palgi, 1970). El piruvato puede regenerarse como PEP con consumo de ATP. La F6P es isomerizada reversiblemente a G6P. Debido a la libre convertibilidad entre la G6P y la F6P y a que netamente la incorporación de una molécula de hexosa consume una molécula de ATP, en lo siguiente ambas hexosas 6-fosfato se consideran simplemente como “G6P”.

Este género carece de una fosfofructocinasa, por lo que ni la glucosa ni la fructosa pueden catabolizarse vía la ruta Embden-Meyerhof-Parnas. Su catabolismo es pues aerobio.

La G6P puede alimentar la ruta de las fosfo-aldolasas o de las fosfo-cetolasas (**PK**), que resulta en la hidrólisis de estos precursores a acetato y eritrosa 4-fosfato (E4P). La E4P puede unirse a la G6P produciendo seduheptulosa 7-fosfato (S7P) y gliceraldehído 3-fosfato (G3P). La reacción de la S7P con el G3P conduce a la síntesis de dos moléculas de ribosa 5-fosfato (R5P). La R5P puede descomponerse en acetyl-fosfato y G3P. Esta última reacción liga el catabolismo de las hexosas con el del etanol.

En resumen G6P puede producir acetato y ribosa 5-fosfato más gliceraldehído 3-fosfato (Parés y Juárez, 1994). La G6P también puede seguir la ruta de la pentosa-fosfato (**PP**) que implica la

oxidación a ácido fosfo-glucónico, con generación de NADH, y la descarboxilación de éste a ribosa 5-fosfato (R5P) (Moat y col., 2002; Wolfe, 2005).

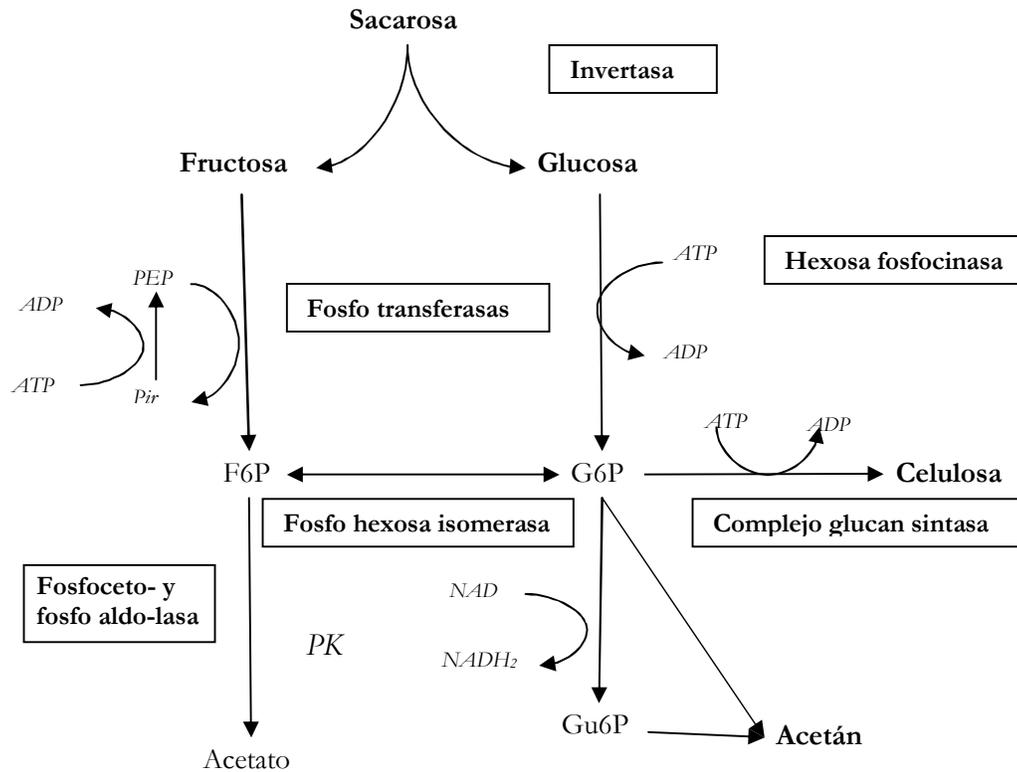


Figura 5.- Esquema de las reacciones del catabolismo de la sacarosa en *Gluconacetobacter* spp y algunas de las enzimas involucradas. F6P y G6P, son la fructosa 6 fosfato y la glucosa 6 fosfato, respectivamente. Gu6P es el ácido glucurónico 6 fosfato y PK representa la serie de reacciones de las enzimas fosfo cetona y fosfoaldolasas.

La oxidación de la glucosa en el periplasma es catalizada por la glicerol-deshidrogenasa, una quinoproteína que también emplea a la PQQ como cofactor (Matsushita y col., 2003, Chávez-Pacheco y col., 2005), liberando ácido glucónico al líquido del entorno. Esta característica de *Gluconacetobacter xylinus*, no es compartida por *Gluconacetobacter entanii* cuyas células no oxidan la glucosa a glucónico en el periplasma (Schüller y col., 2000).

Síntesis de la Celulosa y el Acetán.

La G6P es empleada como iniciadora de la síntesis de celulosa por el complejo enzimático de la glucan-sintasa (*GSEC*), que se encuentra distribuido axialmente en la membrana celular y que implica la unión de la G6P con uridil-pirofosfato como paso previo a la incorporación de la glucosa a una cadena de glucana (Ver Figura 6; Tonouchi y col. 1996; Han y Robyt, 1998). La celulosa así sintetizada es excretada por poros en la membrana, pero no es liberada al medio.

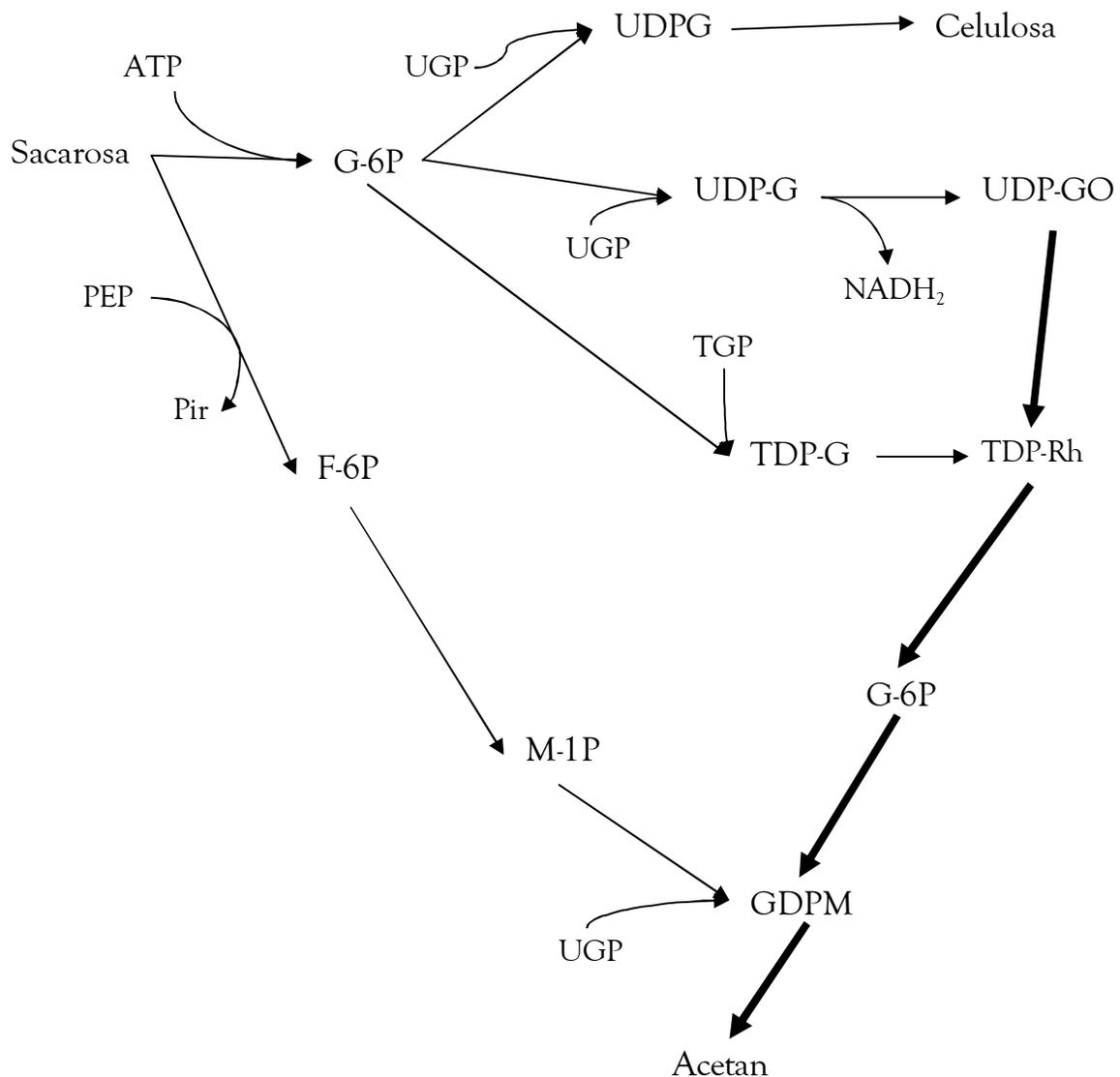


Figura 6.- Esquema de las reacciones de síntesis de celulosa y acetán a partir de la sacarosa. UGP es el uridil glucosa fosfato y TGP el timidil glucosa fosfato. M1P es la manosa 1 fosfato y TDP-Rh es la rhamnosa timidil difosfato, UDPGo es el ácido glucurónico uridil difosfato. Las flechas gruesas no indican reacción, sino el proceso de ensamblaje del monómero del acetán (De Kornmann, 2003a).

Otro complejo enzimático convierte la G6P en manosa 6-fosfato (M6P), oxida otra molécula a ácido glucurónico (Gu6P); una tercera molécula se une a la M6P, al Gu6P y a la rhamnosa 6-fosfato (R6P) para constituir el monómero del acetán, un polímero hidrofílico característico de *Gluconacetobacter xylinus*. La R6P es isomerizada a partir de F6P. (Ishida y col., 2003). (Figura 6).

Anabolismo de la biomasa.

Las mayores variaciones en la composición atómica de la masa celular microbiana se deben a cambios en las condiciones de cultivo, antes que a diferencias entre las especies. Los libros de texto (Bailey y Ollis, 1986; Blanch y Clark, 1997) reproducen las tablas que tanto Atkinson (1983) como Roels (1983) recopilaron sobre esta composición. Su consulta permite observar que la composición atómica *por átomo de carbono* de las células de diversas especies (bacterias, levaduras y hongos), fluctúa para el hidrógeno entre 1.55 y 2 átomos, para el oxígeno de 0.43 a 0.56 y para el nitrógeno de 0.1 a 0.24. La composición atómica promedio puede ser escrita como sigue: $CH_{1.8}O_{0.5}N_{0.2}$ (Cortassa y col., 2002; De Faveri, 2003).

Se ha encontrado que doce compuestos son los comúnmente empleados para sintetizar todas las moléculas de la célula microbiana. Estos compuestos son: *la acetil Coenzima A, la glucosa 6-fosfato, la fructosa 6-fosfato, la ribosa 5-fosfato, la eritrosa 4-fosfato, el gliceraldehído 3-fosfato, el ácido 3 fosfoglicérico, el α -ceto glutarato, la succinil Coenzima A, el oxalo-acetato, el piruvato y el fosfo enol-piruvato*. La descripción antecedente de las rutas catabólicas ha señalado como éstas desembocan en la síntesis de la mayoría de estos precursores del crecimiento. De una manera harto simplificada se puede decir que:

acetil Coenzima A+ glucosa 6-fosfato+ fructosa 6-fosfato+ ribosa 5-fosfato+ eritrosa 4-fosfato+1 gliceraldehído 3-fosfato+ ácido 3 fosfoglicérico+ α -ceto glutarato+ succinil Coenzima A+ oxaloacetato+ piruvato +1 fosfo enol-piruvato = $CH_{1.8}O_{0.5}N_{0.2}$

El enfoque implícito en esta simplificación es el de agrupamiento de las biorreacciones, lo que será empleado para establecer la red de biorreacciones agrupadas del metabolismo íntegro de *Gluconacetobacter xylinus*.

Metabolismo energético.

Las reacciones del catabolismo y el anabolismo, resumidas en los párrafos anteriores, requieren del concurso de varios cofactores: el PQQ, el NAD, el NADP (y sus formas reducidas) y el ATP, entre varios otros. Todos ellos deben ser regenerados, por reoxidación (NADH, NADPH y PQQH₂) o por fosforilación del ADP, en el caso del ATP. Lo primero se logra por la transferencia de electrones al oxígeno a través de la cadena respiratoria formada por un conjunto de metabolitos con capacidad de óxido-reducción. Por cada electrón cedido al oxígeno, se produce la traslocación de un protón al periplasma. Esta expulsión de protones, según la teoría quimiosmótica, genera un gradiente químico y un potencial de óxido-reducción transmembrana. Este gradiente impulsa a un complejo enzimático de ATP-hidrolasa con el resultado de la síntesis de ATP. Si bien se trata de dos conjuntos de reacciones diferentes, realizados por sistemas enzimáticos distintos, al conjunto de todas se le denomina como Fosforilación oxidativa. En este caso NADH y PQQH₂ compiten por el oxígeno. La PQQH₂ y el NADH se distinguen por ceder sus electrones directamente a la ubiquinona 9 o a la ubiquinona 10 (Matsushita y col., 1991; Chávez-Pacheco y col., 2005). El NADPH se reoxida cambiando electrones con el NAD. Por ello, en lo siguiente se analiza sólo las concentraciones de NAD y de PQQ y de sus formas reducidas.

La relación entre el flux de protones asociados a la reoxidación de PQQ y NAD y su retorno a través del complejo ATP hidrolasa, establece un parámetro estequiométrico importante para la bioenergética celular, el “**Coefficiente P/O**” (“P/O”, los moles de ATP que son efectivamente sintetizados por átomo de oxígeno reducido).

El aporte de este trabajo reside en emplear toda esta información para estructurar un modelo simple de algunos intermediarios clave del metabolismo en estado estacionario de las células de *Gluconacetobacter entanii*, a nivel del **metaboloma** (esto es, considerando sólo las reacciones entre las moléculas que integran el flujo de masa y energía, pero sin considerar los fenómenos dinámicos que resultan del control genético).

III.- Motivaciones y Objetivos.

Motivaciones

La bioquímica del género Gluconacetobacter ha sido objeto de atención por algunos investigadores contemporáneos, pero no se ha descrito su metabolismo integral. De hecho, algunos investigadores sostienen que el catabolismo del etanol y el de las hexosas es independiente.

El metabolismo de Gluconacetobacter entanii conduce a la síntesis de dos productos comercialmente importantes (el vinagre y la celulosa bacteriana) y a un tercero (los polímeros hidrofílicos) de uso potencial en la industria de alimentos.

Con la celulosa y el polímero, la bacteria produce una biopelícula. Un modelo estequiométrico del metabolismo puede ser una herramienta útil para desarrollar el modelamiento del crecimiento de las biopelículas.

Objetivo General:

Describir el metabolismo de Gluconacetobacter entanii empleando un modelo estructurado basado en los fundamentos de su bioquímica.

Objetivos específicos:

Estructurar un modelo estequiométrico de crecimiento celular con los fundamentos bioquímicos del metabolismo de Gluconacetobacter entanii

Validar experimentalmente el modelo estequiométrico celular estructurado.

IV.- Materiales y métodos.

IV.1. El sistema experimental.

Para calcular las velocidades de consumo y producción para los sustratos y metabolitos más significativos en el microorganismo modelo, se realizaron experimentos en un reactor operado continuamente y en estados transitorio en reactores por lote. Se emplearon como reactores frascos de vidrio refractario de 2 L de capacidad total.

El estudio involucra el análisis del metabolismo de un microorganismo productor activo de polímeros extracelulares que no se desprenden de la célula, sino que la envuelven, por lo que consistió en la estimación de velocidades de producción y consumo en **modo continuo en reactores con flóculos de biopelícula en suspensión**, lo que es considerado para la estimación de las tasas de las diversas reacciones que se consideraron.

Para acercarse a las condiciones metabólicas de agotamiento de una u otra de las principales fuentes de carbono (hexosas o etanol) se realizaron experimentos en reactores continuos con medio de cultivo carente de etanol, o carente de hexosas, además de los experimentos con un medio con ambos sustratos. En todos los casos se alimentó ácido acético y se conservaron las condiciones de alimentación, agitación, aireación y temperatura constantes durante un lapso igual a tres veces el tiempo de residencia hidráulica, antes de tomar las muestras de ese experimento.

Se realizó los experimentos de modo intermitente por triplicado, creciendo en medio con ambos sustratos, como se detalla más adelante.

IV.2. El microorganismo, su identificación y su conservación.

IV.2.a Identificación.

El microorganismo fue aislado de un cultivo doméstico de “madre” del vinagre. Se caracterizó preliminarmente siguiendo los criterios del manual Bergey's (Swings, 1992), como *Gluconacetobacter xylinus* (*Acetobacter xylinum* previamente) por ser capaz de crecer en el medio de Hoyer, crecer sobre etanol pero no sobre acetato solamente, ser Gram – negativo, aeróbico y capaz de producir una película en la superficie de cultivos en medio líquido. El análisis de su secuencia genética se realizó en el Laboratorio de Microbiología General de la Escuela Nacional de Ciencias

Biológicas por la estudiante de doctorado Eneida Campos Guzmán, bajo la supervisión del Dr. César Hugo Hernández Rodríguez.

Extracción de DNA de las cepas.

La extracción de DNA de la bacteria se inició con cultivos en fase logarítmica de acuerdo con un protocolo previamente descrito (Cullen y Hirsh, 1998). La concentración del DNA y su pureza se estimaron por espectrofotometría a A260 nm y calculando la proporción A260/A280 nm. Una relación A260/A280 nm de 1.8 a 2.1 fue considerado apropiado para llevar a cabo los procedimientos basados en la reacción de polimerasa en cadena (PCR).

Amplificación de los genes 16S rDNA bacterianos.

Los fragmentos de los genes 16S rRNA de cada una de las muestras fueron amplificadas por PCR usando los oligonucleótidos universales para bacterias sentido 8FPL (5'-GCG GAT CCG CGG CCG CTG CAG AGT TTG-3') y antisentido 1492RPL (5'-GGC TCG AGC GGC CGC CCG GGT TAC CTT-3'). La mezcla de reacción contenía 100 ng de DNA genómico; cada uno de los iniciadores apropiados a 0.8 pM; cada uno de los dNTPs a una concentración de 800 μM; MgCl 2.5 mM; y Taq DNA polimerasa (0.1 U) en el regulador para la PCR proporcionado por el fabricante (1X) (Invitrogen Life Technologies). Las condiciones de amplificación incluyeron un paso de desnaturalización por 5 min a 92°C seguido de 35 ciclos consistentes de 1 min a 92°C, 1 min a 53°C, 2.5 min a 72°C, y 10 min a 72°C. El tamaño esperado del amplificado fue de 1500 pb aproximadamente. Todas las PCR se llevaron a cabo en un termociclador Gene Amp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City). Una muestra de 5 a 10 μL de cada producto se analizó por electroforesis en geles de agarosa con regulador TAE 1X a 80 V durante 40 min.

La purificación de los productos de PCR a partir de agarosa se llevó a cabo con el QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen Inc., Valencia, California).

Secuenciación de DNA.

La secuenciación de los productos de la PCR purificados se realizó de manera directa usando los oligonucleótidos 8FPL y 1492RPL. Las secuencias fueron determinadas con el “ABI PRISM 310 genetic analyzer” (Applied Biosystems, Foster City, Calif.). (Ver Apéndice 1).

Identificación molecular

En todas las secuencias obtenidas se indagó que no fuesen el producto de quimeras con el programa en línea CHIMERA-CHECK de la bases de datos RDP-II (<http://35.8.164.52/cgis/chimera.cgi?su=SSU>). Las secuencias parciales fueron sujetas a una búsqueda con el programa en línea BLAST versión 2.2.3 (Altschul y col. 1990) y con ayuda de los programas de la base de datos RDP Analysis Tools of Ribosomal Database Project-II Release 9 (<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>) para buscar la jerarquía taxonómica. Los alinamientos múltiples fueron llevados a cabo con CLUSTAL X (Thompson y col. 1997) seleccionando secuencias emparentadas depositadas en GeneBank del National Center for Biotechnology Information-Taxonomy Homepage (TaxBrowser) y la base de datos ribosomales de la base de datos de Ribosomal Database Project-II. Los porcentajes de similitud nucleotídica se calcularon con ayuda del programa MEGA v. 3.1 (Kumar y col. 2001). La secuencia más cercana fue utilizada para asignar el nivel taxonómico de las secuencias problema. Así los porcentajes de similitud entre la secuencia problema y la secuencia más próxima para definir a nivel de genero y especie fueron 95% y 97.5% respectivamente (Rosello-Mora y col. 2001). Las secuencias con porcentajes de similitud menores a 95% fueron asignados a nivel de la familia más cercana.

IV.2.b Conservación.

El microorganismo se conservó en crecimiento en biopelícula haciendo transferencias a matraces de 250 mL con medio líquido. Se incubó los cultivos sin agitación en una estufa a 30 °C.

El medio de cultivo estándar tiene la siguiente composición que resulta en un pH de ~ 3.5 . (Sokollek, 1997):

Fosfato de Amonio Dibásico	2.4 g/L
Sulfato de Amonio	0.3 g/L
Sulfato de Magnesio Heptahidratado	0.1 g/L
Sacarosa	40.0 g/L
Extracto de levadura	10.0 g/L
Peptona de Caseína	10.0 g/L
Ácido Acético	10.0 g/L
Etanol	20.0 g/L

La composición del medio de cultivo en los experimentos en el reactor continuo fue una variable. De manera sintética se muestra esta composición en g/L, en la Tabla I.

Tabla I.- Composición (g/L) de los diversos medios de cultivo empleados en los experimentos en proceso continuo.

Componente (g/L)	Medio Estándar	Medio Hexosas	Medio Etanol
Fosfato de Amonio Dibásico	2.4	2.4	2.4
Sulfato de Amonio	0.3	0.3	0.3
Sulfato de Magnesio	0.1	0.1	0.1
Sacarosa	40.0	40.0	--
Extracto de levadura	10.0	10.0	10.0
Peptona de Caseína	10.0	10.0	10.0
Ácido Acético	10.0	10.0	10.0
Etanol	20.0	--	20.0

IV.3 Métodos analíticos.

Manejo de las muestras.

Las muestras representativas de cada experimento se vertieron en criotubos con tapa roscada e inmediatamente se sumergieron en nitrógeno líquido, antes de colectarse en una bolsa de plástico identificada y conservarse en un congelador a -4°C en el propio laboratorio hasta su procesamiento al finalizar cada serie de experimentos.

Metabolitos extracelulares.

Los metabolitos extracelulares (etanol, glucosa y fructosa, polímero hidrofílico) se encuentran disueltos en el medio acuoso, o en suspensión en él (celulosa y biomasa). Cada muestra se centrifugó durante 15 minutos a 5 000 rpm y una alícuota del sobrenadante se diluyó diez veces. La muestra diluida se sometió a sonicación en un baño (Aquasonic, Modelo 150D de VDW Scientific Products) durante 15 minutos a un nivel de generación de vibraciones de 9 para desgasificarla. Las muestras diluidas y desgasificadas se filtraron a través de membranas filtrantes (Acrodisc con membrana Versapor de $.45\ \mu$ de diámetro de poro) previo a su inyección en un Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución (Perkin Elmer 200 con detectores de índice de refracción S200 y ultravioleta 785A y una columna Sphen 10 RP-18, a temperatura ambiente). Se empleó como fase móvil una solución 1 mM de H_2SO_4 a 0.7 mL/min.

Analitos solubles.

El **alcohol etílico**, el **ácido acético** y las **hexosas** son especies químicas con una gran solubilidad en agua. Una dilución 1:10 permitió que la concentración de los analitos en el medio de cultivo estuviera en el rango de sensibilidad del método desarrollado. Se detectaron los tiempos de retención en la columna para el ácido acético, el etanol y las hexosas (glucosa y fructosa en un solo pico) cuya concentración se calculó calibrando contra el área de los picos de mezclas de estándares analíticos de los mismos compuestos. Las señales más distintivas se obtuvieron con el detector de UV para el etanol y el acético y en el detector de índice de refracción para las hexosas.

El **oxígeno** se midió con el electrodo sensor en el mosto a la salida del bio – reactor después de haber calibrado como referencia la saturación del mosto con aire a la presión atmosférica después de 30 minutos de aspersión.

El microorganismo también produce un **polímero hidrofílico**, cuya medición gravimétrica se describe en el siguiente apartado. Este es un polisacárido que precipita en presencia de etanol absoluto.

Analitos en suspensión.

Las especies químicas conservadas que se encuentran en suspensión son la celulosa y la propia masa celular o biomasa. La celulosa es insoluble en agua y, obviada aparte, también los son las células microbianas.

Una muestra en un tubo Eppendorf se centrifugó a 5 000 rpm durante 15 min. El sobrenadante contuvo al polisacárido hidrofílico y se vertió a un recipiente con dos volúmenes de etanol absoluto, lo que resultó en su precipitación. La mezcla se filtró a través de una membrana de Nylon a peso constante y conocido. La membrana se secó en un horno de microondas durante 15 minutos a 15 % de la potencia. (Schulze, 1998). La diferencia en peso se consideró como la masa de **polímero hidrofílico**.

El paquete celular de la misma muestra se resuspendió en agua y se filtró en una membrana de celulosa a peso constante y conocido. La membrana en seguida fue secada durante 15 minutos a 15 % de potencia en un horno de microondas. La diferencia en peso se consideró como las células más su celulosa adherida.

Otra muestra fue centrifugada durante 15 minutos a 5 000 rpm y al paquete celular (una vez desechado ese sobrenadante) se le añadió una solución de NaOH 2N, reponiendo el volumen del sobrenadante desechado, y se calentó durante 15 minutos a 65 °C (Yong Jung, 2005). El contenido del tubo Eppendorf se centrifugó dos veces, desechando el sobrenadante y el paquete celular de la segunda centrifugación se resuspendió en agua para filtrarse en una membrana de celulosa a peso constante y conocido. La diferencia en peso se consideró como la **celulosa**.

A una muestra tratada así se le ensayó para medir su concentración de nitrógeno amoniacal y se encontró que no había una cantidad medible. Por ello se concluyó que el tratamiento alcalino y térmico efectivamente solubilizó el material intracelular.

Se calculó la **biomasa** por diferencia entre los pesos de la muestra de celulosa más células, menos el de la celulosa tras la hidrólisis alcalina de la biomasa.

Por su parte la **celulosa** fue identificada por una prueba cualitativa. Una muestra de la celulosa del cultivo fue lavada por centrifugación. A una porción pequeña se le añadió tres gotas de ácido fosfórico en un tubo de ensaye tapado con un papel filtro humedecido con acetato de anilina. La muestra fue carbonizada observando una coloración rosa desarrollada en el papel filtro. (Odegaard, 2000).

Metabolitos intracelulares.

Se midieron tres metabolitos intracelulares clave para la descripción del metabolismo estructurado: el Adenosín Trifosfato (ATP), el Nicotín Adenosín Dinucleótido (NAD) y la Pirrolo quinolín quinona (PQQ). Para ello se concentró la biomasa mediante la centrifugación de hasta 6 mL del medio de cultivo en un mismo tubo Eppendorf. El paquete con la biomasa se resuspendió en 1 mL de agua y se le añadieron 9 mL de reactivo TRIS-EDTA. En seguida se llevó a un baño de agua a ebullición durante 10 minutos e inmediatamente a un baño de agua a 4 °C (Gikas y Livingston, 1998). Una muestra tratada así se empleó para medir el ATP por un ensayo enzimático y otra para medir NAD y PQQ por espectrofotometría de barrido (Rodríguez-Carranza, 2004; González-Higuera, 2004).

El **ATP** fue medido empleando un paquete enzimático con el complejo proteínico de la luciferina (una proteína que emite fotones al oxidarse) y la Luciferasa (que es la enzima que oxida a la Luciferina) (Gikas, 1998). La luciferasa requiere de ATP como cofactor y por ende, en un sistema estandarizado la cantidad de fotones emitidos es proporcional al ATP presente. La medición lumínica se realizó en un luminómetro “Triathler Multilabel Tester”. El cálculo de la cantidad de ATP se realizó empleando una curva de calibración previamente establecida (Fernández-Sandoval, 2004).

Para la detección de **PQQ** en un espectrómetro de barrido (de 190 a 600nm) con detector de UV-VIS, se preparó una dilución del medio de cultivo que fue ensayada y a la que se le añadieron hasta 8 cantidades diversas de una solución de PQQ, todas las que fueron analizadas, notándose un incremento a 263 nm, que sólo se debió al PQQ añadido (González-Higuera, 2004). El espectrograma, además de señalar la banda de absorción del compuesto, sirvió como curva tipo para el análisis de las muestras (Ramírez - Silva, 2004).

Una gráfica de calibración similar se realizó con medio de cultivo y adiciones de soluciones con masa conocida de **NAD** (Rodríguez-Carranza, 2004; Ramírez - Silva, 2004).

IV.4 El biorreactor y su caracterización.

Los biorreactores se construyeron con frascos de aspiración de vidrio refractario de 2 L de capacidad total, con boca para tapón de hule del número 10. El tapón de hule fue horadado para admitir una manguera de alimentación de medio estéril, la alimentación de aire comprimido a un difusor de vidrio poroso, la salida del venteo de aire y un termopozo de acero inoxidable. La espita lateral inferior del frasco fue empleada para la salida del medio fermentado del bio - reactor.

Cada frasco se cubicó para señalar el nivel de 1 y 1.5 L.

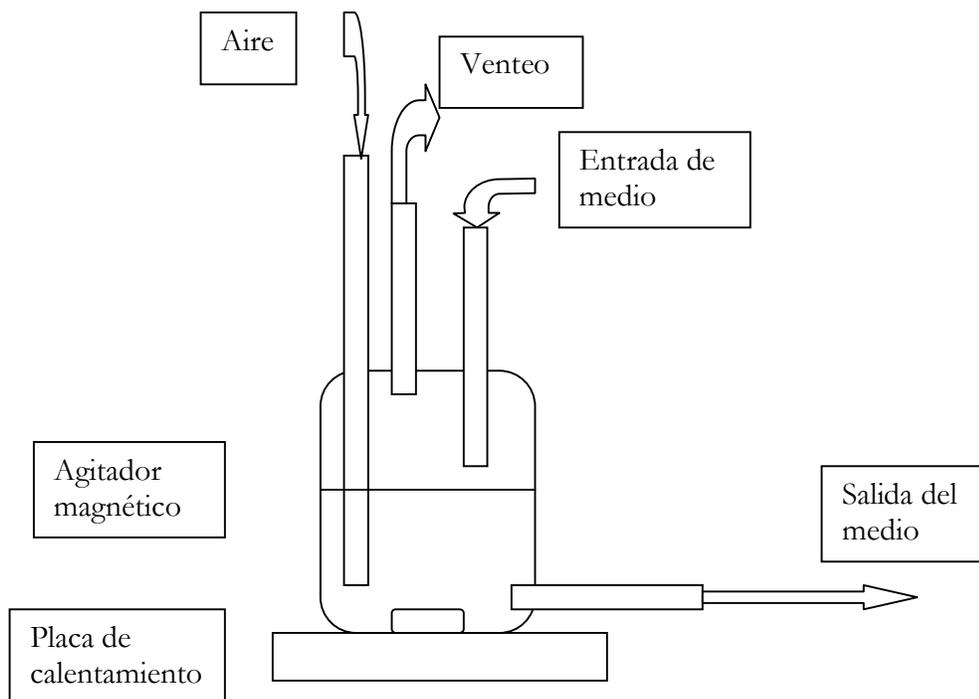


Figura 7.- Esquema del biorreactor.

Sistema de adiciones.

Para controlar el volumen del reactor y el flujo de alimentación, se empleó una combinación de bombas peristálticas (Cole Parmer, Masterflex e Easyflow) para dosificar flujos desde 1 hasta 2.5 mL/min. Se esterilizó el volumen del medio de cultivo necesario con la formulación diseñada para cada experimento. Se esterilizó los reactores vacíos por separado, con la manguera necesaria y sellada de cada uno.

Se introdujo asépticamente el extremo estéril de las mangueras al medio estéril y frío y, se llenó cada reactor hasta el volumen necesario. Se inoculó los reactores con un cultivo de matraces incubados por 72 h a 30 °C sin agitación y se inició el proceso por lote de los reactores durante 24 h con las condiciones de agitación, aireación y temperatura estables.



Figura 8.- Imagen del dispositivo experimental empleado.

Tras ese lapso, se reguló el flujo a cada reactor para lograr las tasas de dilución previstas. El flujo de entrada se ajustó para mantener el volumen del bio – reactor constante y el flujo de salida se dosificó con la bomba peristáltica controlada para descargar el flujo previsto, el cual fue registrado y controlado cada tres horas. Las condiciones de temperatura, adiciones, flujo de aire y agitación se controlaron durante un tiempo equivalente al de tres tiempos de residencia (el inverso de la tasa de dilución) antes de tomar las muestras de ese experimento.

Sistema de mezclado.

Los reactores fueron agitados mediante barras magnéticas impulsadas por un imán rotatorio en una placa de calentamiento. La agitación mecánica se calibró (en conjunción con la agitación lograda por la aspersión del aire comprimido), y se midió ópticamente el tiempo de mezclado mediante el empleo de tinción de azul de metileno. Para una tasa de aireación de 0.2 vvm, se midió 11 s de tiempo de mezclado, para 0.4 vvm, el tiempo de mezclado fue de 7 s y para 0.6 vvm de aireación el tiempo de mezclado fue de 6 s. A una aireación de 0.8 vvm no se logró medir el tiempo de mezclado.

Sistema de aireación.

Como se ha descrito, los reactores fueron servidos con difusores de vidrio poroso colocados 1 o 2 cm sobre el fondo del reactor, y justo sobre el giro del agitador magnético. La tasa de transferencia de oxígeno lograda con los difusores fue calculada a partir de mediciones con un electrodo sensor de oxígeno disuelto (Orion), analizando los perfiles de oxígeno en el tiempo a distintas velocidades específicas de aireación (vvm). Estos perfiles fueron analizados considerando que la transferencia de oxígeno obedece a un proceso descrito por la siguiente ecuación:

$$\frac{dC_{OL}}{dt} = k_L a_V (C^* - C_{OL}) \quad (4).$$

La integración de esta ecuación diferencial y su linealización contra el tiempo, permite calcular el Coeficiente Volumétrico de Transferencia de oxígeno a diversas velocidades de aireación. A 0.3 vvm se estima un coeficiente global de transferencia de oxígeno de 4.3 h^{-1} (0.012 s, es el tiempo característico $[k_L a_V^{-1}$, Sweere, 1987] del fenómeno de transferencia de oxígeno a esta velocidad de

aireación, la que se escogió porque es el mejor compromiso entre aireación, mezclado y transferencia de oxígeno). Para mayor detalle, consultar el Apéndice A3.

Sistema de control de temperatura.

La temperatura se registró cada 3 h en termómetros de mercurio y en caso necesario se ajustó con el sistema de reóstato de la placa metálica de calentamiento y agitación que soportó a cada reactor.

pH.

El pH fue monitoreado en el efluente del reactor mediante un potenciómetro (Conductronic, pH120).

V.- Resultados

V.1.- El Modelamiento.

V.1.1. El sistema de biorreacción.

El reactor se operó con las células envueltas en una capa porosa de polímeros extracelulares y agua.. El esquema de las fases y los fenómenos de transporte y reactivos contemplados se puede ver en la Figura 2 y el tratamiento de las ecuaciones de conservación de masa se presenta con detalle en el Apéndice A.3.

Comparación de los tiempos característicos de los fenómenos en el bio – reactor.

La Tabla II muestra los tiempos característicos (Sweere y col., 1987) de los procesos de bio – reacción, transferencia de oxígeno, mezclado y difusión. El tiempo característico de crecimiento es la inversa de la tasa de crecimiento (μ_{\max}^{-1}), el de transferencia de oxígeno es la inversa del coeficiente global de transferencia de oxígeno (k_{l,a_v}^{-1}), el de mezclado fue medido directamente y el tiempo característico para la difusión se define como $\frac{l_{bp}^2}{D_{eff}}$ (radio de un flóculo de biopelícula= $l_{bp} \sim 0.5$ mm y D_{eff} de la glucosa en biopelícula se considera de $0.65 * 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$; Cronenberg, C. C. H, 1994).

Tabla II.- Comparación de los tiempos característicos de los fenómenos de transporte y reacción en los biorreactores de vidrio de 2 L de capacidad total, en las condiciones de agitación y aireación ya descritas.

Fenómeno	Crecimiento	Transferencia de O ₂	Mezclado	Difusión
Tiempo característico (h)	25	0.23	0.0028	0.106

Un análisis de la Tabla II nos permite observar que el tiempo característico mayor corresponde al de la biorreacción, que es dos órdenes de magnitud mayor que los fenómenos de transferencia de oxígeno y de transporte difusivo. Un primer resultado de este análisis es que el

sistema experimental con partículas en suspensión puede en este caso ser considerado como realizado con células libres, pues los fenómenos de transporte no limitan la velocidad de reacción por ser ésta dos órdenes de magnitud mas pequeña.

Tasas de Crecimiento y de Dilución.

En los experimentos continuos, no se presenta acumulación de etanol, oxígeno, glucosa, fructosa o ácido acético. Pero si se apreció la acumulación de flóculos de biopelícula en los reactores. La conservación de biomasa en rigor debe de ser considerada como sigue:

$$V \frac{dC_X}{dt} = V \mu_X C_X - Q_V C_X > 0 \quad (5)$$

Donde V , es el volumen en el reactor, C_X es la concentración de biomasa en el reactor, μ_X es la tasa específica de crecimiento y Q_V el flujo de alimentación (y de salida) del reactor. t es el tiempo.

Para realizar un análisis de orden de magnitud, definimos (C_{X0} , es la concentración inicial de biomasa):

$$U \equiv \frac{C_X}{C_{X0}} \quad (6)$$

Haciendo el cambio de variable, dividiendo entre el volumen del reactor y definiendo $D = \frac{Q_V}{V}$ (7):

$$\frac{dU}{dt} = \mu_X U - DU = U(\mu_X - D) > 0 \quad (8)$$

De los resultados experimentales obtenidos, se estimó que $C_X \sim 1.0$ g/L, $C_{X0} \sim 0.1$ y $t \sim 150$ h (tres veces el tiempo de residencia a la mínima tasa de dilución empleada, $D = 0.02$ h⁻¹).

$$\frac{1}{150} = 0.006 = \mu_X - D > 0 \quad (9)$$

En los experimentos realizados $D \sim 0.06$ por lo que podemos considerar que se obtendrán resultados con un error de 10 % de desviación respecto a un quimiostato.

A ello debe agregarse que los consumos de las fuentes de carbono deben tomarse como **consumos aparentes**, pues no se valoró el consumo de compuestos nitrogenados y carbonados de los componentes complejos del medio de cultivo (extracto de levadura y peptona de caseína). Por ello, en la discusión de resultados se hará un énfasis mayor en el análisis **cuantitativo** de estos.

V.1.2. El metabolismo de Gluconacetobacter entanii.

La Figura 9 muestra un esquema del metabolismo integral de *Gluconacetobacter entanii*, señalando la interrelación entre las rutas de desasimilación de etanol y de la glucosa, así como el papel que juegan los metabolitos intracelulares ATP, NAD y PQQ y su interrelación en la fosforilación oxidativa.

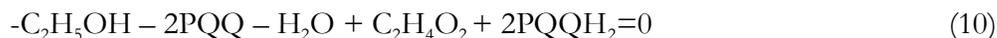
Se muestra asimismo su conexión con las rutas centrales del metabolismo de este género: el ciclo de los ácidos tricarbónicos a través de la desviación del glioxilato, la gluconeogenesis a partir del piruvato, la utilización de la fructosa 6fosfato a través de la ruta de las fosfoacetato y fosfo aldolasas.

Finalmente, se muestra también las reacciones de polimerización de hexosas para producir celulosa y un polímero hidrofílico. De ahí, surge la posibilidad del consumo simultáneo o alternativo de las hexosas y del etanol con el funcionamiento del metabolismo integral.

Las reacciones del metabolismo.

Las reacciones reseñadas en el estado actual del conocimiento de la bioquímica de *Gluconacetobacter* spp (II.2) tienen una estequiometría que se describe como sigue:

Transporte y oxidación del etanol.



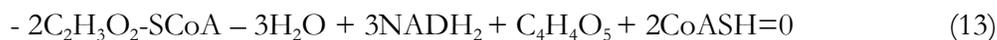
Formación de acil-fosfato.



Formación de acetyl-CoA.



Ciclo de los Ácidos Tricarboxílicos (Desviación del Glioxilato)



Descarboxilación del óxalo-acetato a piruvato.



Síntesis de fosfo enol – piruvato.



.

Síntesis de α -ceto-glutarato.



Transporte de glucosa y fosforilación.



Transporte de fructosa y fosforilación.



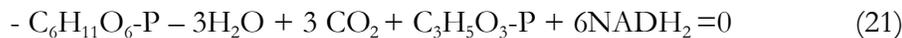
Síntesis de Celulosa



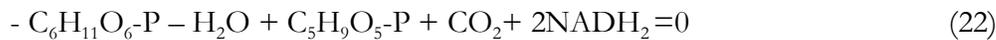
Síntesis del polímero hidrofílico (presumiblemente acetán).



Síntesis del gliceraldehído.



Ruta de la pentosa fosfato



Ruta de las fosfo ceto- y fosfo aldolasas.



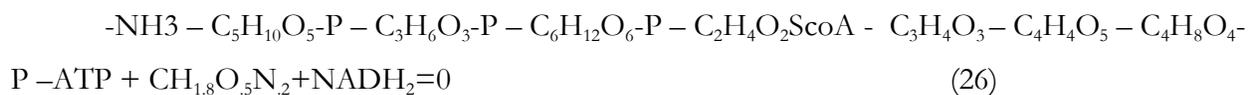
Gluconeogenesis.



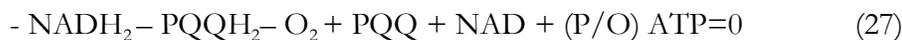
Síntesis del ácido -3 fosfoglicérico.



Las reacciones del anabolismo.



Fosforilación oxidativa.



Excreción de CO₂



Excreción del ácido acético.

$$- [C_2H_4O_2]_{\text{met}} + [C_2H_4O_2]_{\text{prod}} = 0. \quad (29)$$

En estas ecuaciones:

C_2H_5OH es el etanol,

$C_2H_4O_2$ es el ácido acético,

$C_2H_3O_2 \sim P$ es al acil-fosfato,

CoASH es la Coenzima A,

$C_2H_3O_2\text{-SCoA}$ es la acetil- coenzima A,

$C_4H_4O_5$ es el oxalo-acetato,

$C_3H_4O_3$ es el piruvato, es el fosfo enol-piruvato,

$C_5H_6O_5$ es el α -ceto glutarato,

$C_6H_{12}O_6$ es la glucosa,

$C_6H_{11}O_6\text{-P}$ es la glucosa 6-fosfato,

$C_3H_5O_3\text{-P}$ es el gliceraldehído 3-fosfato,

$C_5H_9O_5\text{-P}$ es la ribosa 5-fosfato.

Estas reacciones se agrupan siguiendo las siguientes reglas:

1.- Las reacciones en serie o los ciclos de reacciones son agrupadas como una sola reacción.

2.- Se identifican los puntos de convergencia y divergencia.

3.- Las reacciones agrupadas conservan los elementos químicos y el grado de óxido-reducción.

4.- Se conserva asimismo la energía libre.

5.- La conservación de los metabolitos intracelulares requiere que la excreción de metabolitos se considere como una reacción.

Aplicando estas reglas se agrupan las reacciones como se muestra en la Tabla III y en el esquema de la Figura 10.

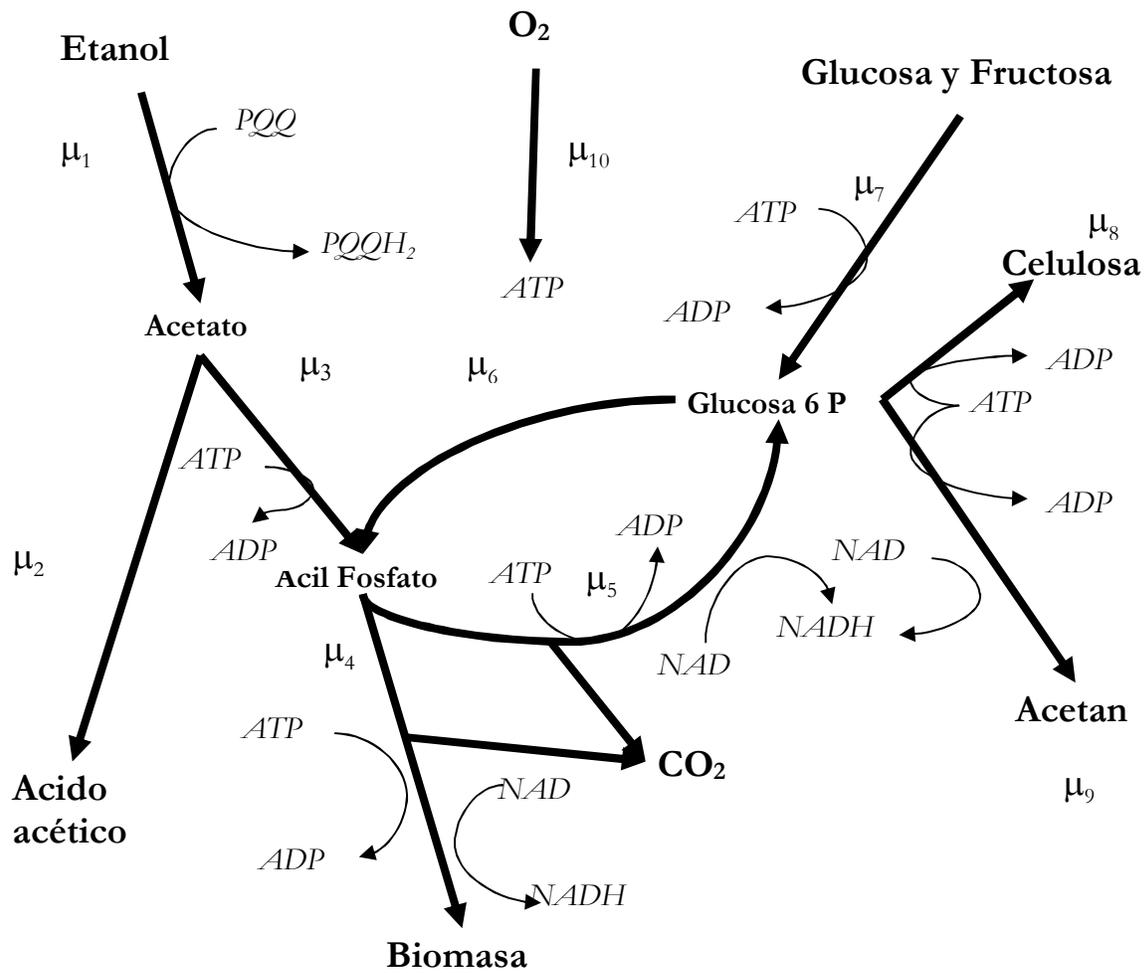


Figura 10.- Esquema de la red metabólica de las reacciones agrupadas del metabolismo complejo de *Gluconacetobacter entanii*. $\mu_1 - \mu_{10}$ son las tasas de las reacciones metabólicas agrupadas como se definen en la Tabla III ($\text{mol g-molC}_{\text{bm}}^{-1} \text{h}^{-1}$).

Tabla III.- Las tasas específicas de las reacciones agrupadas del metabolismo integral y su estequiometría.

Tasa	Estequiometría	Comentario.
μ_1	$- \text{CH}_3\text{O}_{0.5} - \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O} - \text{PQQ} + \text{PQQH}_2 + \text{CH}_2\text{O}_i = 0$ (30)	Ingreso de etanol y oxidación a acetato intracelular con reducción paralela de PQQ
μ_2	$- \text{CH}_2\text{O}_i + [\text{CH}_2\text{O}]_A = 0$ (31)	Ingreso o producción de ácido acético
μ_3	$- \text{CH}_2\text{O}_i - \frac{1}{2} \text{ATP} + \text{CH}_{3/2}\text{O} \sim \text{P}_{1/2} = 0$ (32)	Síntesis del acil-fosfato.
μ_4	$-1.1 \text{CH}_2\text{O}_i - Y \text{ATP} - 0.2 \text{NH}_3 + 0.1 \text{NADH} + 0.1 \text{CO}_2 + \text{CH}_{1.8} \text{O}_{0.5} \text{N}_{0.2} = 0$ (33)	Anabolismo de material celular (biomasa, $\text{CH}_{1.8} \text{O}_{0.5} \text{N}_{0.2}$), con producción de CO_2 y NADH, y consumo de Y moles de ATP por mol C de biomasa.
μ_5	$-1.33 \text{CH}_2\text{O}_A - 1.33 \text{ATP} + 0.33 \text{CO}_2 + \text{CH}_{11/6}\text{O} \sim \text{P} + 0.66 \text{NADH}_2 = 0$ (34)	Gluconeogenesis.
μ_6	$- \text{CH}_{11/6}\text{O} \sim \text{P} + \text{CH}_2\text{O}_i + \text{P}_i = 0$ (35)	Ruta de las fosfo-ceto- y fosfo-aldolasas.
μ_7	$- \text{CH}_2\text{O}_G - (1/6) \text{ATP} + \text{G6P} = 0$ (36)	Transporte y fosforilación de la glucosa.
μ_8	$- \text{G6P} - 1/6 \text{ATP} + 1/n[\text{CH}_2\text{O}] = 0$ (37)	Polimerización de la G6P a celulosa $[\text{CH}_2\text{O}]_n$.
μ_9	$- \text{G6P} - 1/6 \text{ATP} + 1/n[\text{CH}_{83/42}\text{O}_{23/21}] + .107 \text{NADH} = 0$ (38)	Polimerización de la G6P a acetán $[\text{CH}_{83/42}\text{O}_{23/21}]_n$
μ_{10}	$- \text{O}_2 - \text{NADH} - \text{PQQH}_2 + (\text{P/O}) \text{ATP} = 0$ (39)	Fosforilación oxidativa, con generación de 2 P/O moles de ATP por mol de O_2 reducido.

Las ecuaciones 30 – 39 de la Tabla III expresan la estequiometría del microorganismo. La figura 10 muestra la red de las reacciones agrupadas también en términos estequiométricos como si el flujo de masa en esa red fuera continuo y estable, obviando la cinética de esas mismas reacciones.

Modelo estequiométrico del estado estacionario de los metabolitos intracelulares de *Gluconacetobacter entanii*.

En seguida se establecen las ecuaciones de conservación de los metabolitos clave para nuestra descripción del metabolismo de *Gluconacetobacter entanii*: **acetato, acil-fosfato, glucosa 6-fosfato, NAD, PQQ, ATP**. Tres supuestos dan base a esto: a) la acumulación es cero (el nivel de los metabolitos intracelulares clave está en estado cuasi-estacionario); b) los metabolitos que se encuentran en dos formas distintas (oxidadas/reducidas, adenil fosfatos, en nuestro caso) y que se ínter convierten en las distintas reacciones del metabolismo, contienen la misma información y por ello se conserva sólo una de sus formas, c) hay reacciones específicas intracelulares (micro) que igualamos a las tasas de las reacciones observables en el medio líquido (macro). Las tasas de reacción en el líquido (r_i), a diferencia de las tasas metabólicas (μ_i , g mol C_i g mol C_{bm}⁻¹ h⁻¹), consideran los aspectos cinéticos de la reacción, no sólo los estequiométricos.

Por lo anterior, las ecuaciones de conservación derivadas de la estequiometría de las reacciones agrupadas del metabolismo son:

$$\mu_{ATP} = -\frac{\mu_3}{2} - Y_{ATP} r_X - \frac{4}{3}\mu_5 - \frac{1}{6}r_G - \frac{1}{6}r_{P1} - \frac{1}{6}r_{P2} + (2 * \frac{P}{O})r_{O_2} = 0 \quad (40)$$

$$\mu_{NADH} = \frac{1}{10}r_X + \frac{2}{3}\mu_5 + \frac{3}{28}r_{P2} - 2 * (1 - \phi)r_{O_2} = 0 \quad (41)$$

$$\mu_{PQQH_2} = r_E - 2\phi r_{O_2} = 0 \quad (42)$$

$$\mu_A = r_E \pm r_A \pm \mu_3 = 0 \quad (43)$$

$$\mu_{A \sim P} = \pm \mu_3 - \frac{11}{10}r_X - \frac{4}{3}\mu_5 + \mu_6 = 0 \quad (44)$$

$$\mu_{G6P} = r_G - \mu_6 - r_{P1} - r_{P2} + \mu_5 = 0 \quad (45)$$

$$\mu_{CO_2} = \frac{1}{10}r_X + \frac{1}{3}\mu_5 = 0 \quad (46)$$

Donde r_i es la tasa específica de desaparición o aparición de sustratos o metabolitos en el medio de reacción, $i = E$ (etanol), G (glucosa), A (ácido acético), X (biomasa), P₁ (celulosa), P₂ (acetán), O₂ es oxígeno y CO₂ es dióxido de carbono. P/O indica los moles de ATP realmente

synthesized per atom of reduced oxygen and Y the moles of ATP employed in the biosynthesis per atom of carbon of the biomass.

En seguida se define la relación entre las reacciones intracelulares de consumo o producción de metabolitos (μ_i), y las tasas de desaparición o aparición de estas especies químicas en el medio líquido (r_i):

$$r_E - \mu_1 = 0 \quad (47)$$

$$r_A - \mu_2 = 0 \quad (48)$$

$$-r_X + \mu_4 = 0 \quad (49)$$

$$r_G - \mu_7 = 0 \quad (50)$$

$$-r_{P1} + \mu_8 = 0 \quad (51)$$

$$-r_{P2} + \mu_9 = 0 \quad (52)$$

$$r_{O_2} - \mu_{10} = 0 \quad (53)$$

Las ecuaciones 47 – 53 son definiciones que no alteran las ecuaciones 40 – 46, pero que formalizan el enfoque de reactor pseudo-homogéneo, que considera a la biomasa como una fase continua. Con ello podemos establecer la ecuación de conservación de la masa total alrededor de esa fase pseudo homogénea.

Las masas moleculares de las especies consideradas son: etanol: 46; glucosa: 180; oxígeno:32; ácido acético: 60; biomasa: 24.6; celulosa: (180n), polímero hidrofílico: (189n) y bióxido de carbono: 44, (donde “n” es el número de monómeros en los polímeros).

La conservación de los metabolitos y el biorreactor.

Puesto que la conservación en el líquido se realiza respecto a las especies químicas considerándolas por átomo de carbono:

$$-23r_E - 30r_G - 32r_{O_2} - 30r_A + 24.6r_X + 30r_{P1} + 31.5r_{P2} + 44r_{CO_2} = 0 \quad (54)$$

La ecuación 54 plantea la conservación global de masa en la fase pseudo-homogénea de la biomasa y se suma a las ecuaciones 40 a 46 como una restricción más.

Para el análisis de los resultados experimentales que se mostrarán en el siguiente apartado, se resolvió el sistema de ecuaciones en función de las ecuaciones 40-46 y 54.:

$$r_{ATP} = \left(3\frac{P}{O} - \frac{9}{2}\right)r_E + \left(2\frac{P}{O} - \frac{9}{2}\right)r_A + \left(2\frac{P}{O} - \frac{25}{6}\right)r_G - \left(Y - 4.4 - 21\frac{P}{O}\right)r_X - \left(2\frac{P}{O} - 3.83\right)r_{P1} - \left(1.893\frac{P}{O} - 3.83\right)r_{P2} \quad (55)$$

Esta ecuación refleja el efecto de las diversas reacciones de nivel macro en el consumo de ATP, así como su potencial reproducción por efecto de la generación de cofactores reducidos y su reoxidación por fosforilación oxidativa según el nivel de eficiencia P/O. r_{ATP} incorpora la estequiometría de las reacciones agrupadas de la red del metabolismo de *Gluconacetobacter entanii* y, además, la cinética específica a cada una de las reacciones de consumo y producción de la biomasa.

En la figura 11 se muestra un esquema del biorreactor en operación continua. Según el flujo de alimentación y su composición, la población microbiana en el líquido, tendrá una concentración dada, y en su interior un nivel del metabolito adenosín trifosfato. La conservación de la especie intracelular considerará las reacciones intracelulares en las que intervenga el metabolito intracelular y su salida del reactor por efecto de la salida de células del mismo.

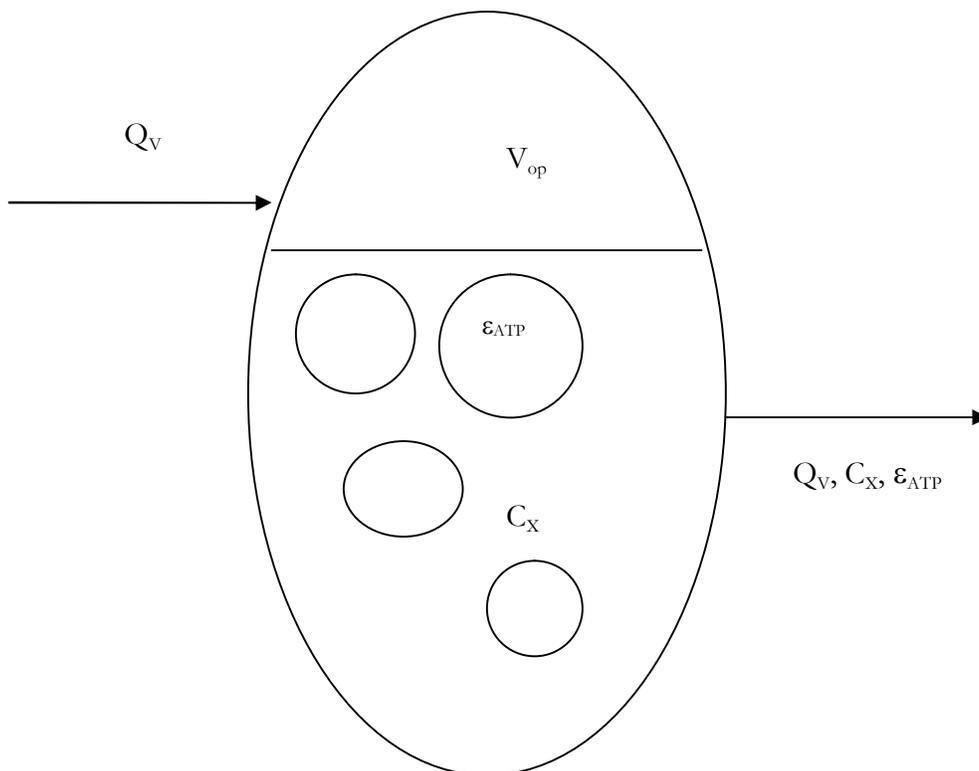


Figura 11.- Esquema de la operación continua de un biorreactor, alimentado con un flujo Q_V , manteniendo un volumen V_{op} y una concentración de biomasa C_X , en cuyo interior se mantendrá un nivel ϵ_{ATP} del ATP.

V.2.- Resultados Experimentales

V.2.1.- De la clasificación del microorganismo.

Un análisis de apareamiento de las secuencias de bases nucleotídicas (BLAST) de su gen 16S muestra que el microorganismo aislado y objeto de este estudio tiene un 99.89 % de similitud con la secuencia del gen 16S de *Gluconacetobacter entanii* (Schüller y col., 2000). Solamente difirió en una base de las 957 analizadas, por lo que según los criterios arriba expuestos pertenece a la especie. *Gluconacetobacter entanii* (ver Tabla IV).

Tabla IV.- Comparación de las bases diferentes en el gen 16S de cepas del género con respecto a las del gen 16S de la cepa objeto de este estudio entre las bases totales y el porcentaje de similitud

Parientes más próximos dentro del género y código de acceso en GeneBank.	Bases diferentes/ total de las bases	Porcentaje de similitud en las pb (%)
<i>Gluconacetobacter azotocaptans</i> ; AF192761	27/945	97.14
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> ; X75618	43/1295	96.68
<i>Gluconacetobacter entanii</i>. AJ251110	1/945***	99.89
<i>Gluconacetobacter europaeus</i> ; Y15289	17/1295	98.69
<i>Gluconacetobacter hansenii</i> ; AB166734; AB166734	7/1295	99.46
<i>Gluconacetobacter intermedius</i> ; AB166739	22/1295	98.30
<i>Gluconacetobacter johannae</i> ; AF111841	34/1295	97.37
<i>Gluconacetobacter liquefaciens</i> ; AF127391	41/1295	96.83
<i>Gluconacetobacter multiaceti</i>; AB166744	1/945****	99.89
<i>Gluconacetobacter oboediens</i> ; AJ001631	22/1295	98.30
<i>Gluconacetobacter persimmonensis</i> ; AB095100	2/1295	99.84
<i>Gluconacetobacter polyoxogenes</i>	**	ND
<i>Gluconacetobacter rhaeticus</i> ; AY180961	17/1295	98.68
<i>Gluconacetobacter sacchari</i> ; AF127412	40/1295	96.91
<i>Gluconacetobacter saccharivorans</i> . AB166740; AB166741	22/1295	98.30
<i>Gluconacetobacter swingsii</i> AY180960	17/1295	98.68
<i>Gluconacetobacter xylinus</i> ; X75619	19/1295	98.53
<i>Acetobacter lovaniensis</i> ; AJ419837	65/1295	94.98

** No hay secuencias del gen ribosomal 16S rDNA depositadas en GeneBank

***La comparación se realizó con las secuencias disponibles, que fueron de menor longitud que el resto de las especies.

**** Lisdianty y col. informaron en 2004 de las bases de datos de esta cepa, sin embargo no se ha depositado una cepa con ese gen ni se ha publicado la propuesta de taxonómica hasta la fecha.

V.2.2.- De los resultados en estado cuasi-estacionario

Se realizó varios experimentos en reactor continuo agitado; la mayor tasa de dilución se seleccionó como un poco menor que la tasa máxima específica de crecimiento previamente medida para el microorganismo (Razo Contreras, 2001), en la lógica del crecimiento de células libres y para evitar su lavado.

La Tabla V muestra las concentraciones experimentales de los sustratos y de los productos, tanto en la alimentación como a la salida de los reactores, así como las concentraciones intracelulares de ATP, PQQ y NAD, para las distintas velocidades de reacción como para las distintas composiciones del medio de cultivo. Éstas se escogieron para conocer la influencia de diversas composiciones del entorno en la fisiología del microorganismo y a diversas tasas de dilución asociadas a diversas tasas de consumo de los sustratos.

En la Tabla V se observa que las mayores concentraciones de biomasa se obtuvieron en el medio con sacarosa como fuente de carbono. Esto mismo ocurrió con el acetán, aunque la mayor productividad se logró en el medio estándar a la más alta velocidad de crecimiento (0.37 g/l-h). Las mayores concentraciones de celulosa se muestran en el medio estándar acoplado a que la mayor productividad volumétrica se muestra en este medio a la más alta tasa de crecimiento: (0.106 g_{P1}/L-h). El comportamiento de los principales productos metabólicos poliméricos es atípico, pues lo común es que a la más baja tasa de dilución se encuentren las mayores concentraciones y estas disminuyan a mayores tasas de dilución.

Es notable que, pese a las diferencias que se encuentran en las concentraciones de acetán y celulosa en los distintos medios de cultivo, sí se produzcan ambos polímeros aún en el medio que contiene sólo etanol y ácido acético como medio de cultivo. Esta observación confirma nuestra interpretación de la red metabólica que muestra la interrelación entre los reservorios de acetil-fosfato, acetato y G6P, a través de la gluconeogenesis y la vía de las fosfoctolasas (Figura 12). En el caso que se discute, el consumo de etanol y ácido acético alimenta el ciclo de los ácidos tricarbónicos y de ahí la síntesis de biomasa, pero también a la gluconeogenesis y al reservorio de G6P, materia prima para la síntesis de acetán y celulosa.

En el medio estándar, se muestran los siguientes resultados: a las tasas de dilución de 0.02 y 0.078 h⁻¹, la concentración de glucosa en el mosto de alimentación fue de ~ 100 g L⁻¹ y las tasas de consumo de etanol fueron casi nulas, pero la de glucosa se muestra en el mismo nivel que la tasa de consumo de glucosa en el medio con sacarosa, a una dilución comparable. Se observa un fenómeno

de inhibición, pero no en el consumo de glucosa, sino en el de etanol. Los niveles intracelulares de ATP, NAD y PQQ son mayores en la tasa de dilución de 0.06 h^{-1} (sin inhibición), en tanto que son menores en las otras dos diluciones, indicando una baja actividad metabólica (Figura 19). Es presumible una alta concentración intracelular de G6P (Mauch y col., en Schügerl, 2000) y aunque en este medio se presentan las más altas tasas de síntesis de los polímeros - celulosa y el polisacárido hidrofílico - un desbordamiento del reservorio de la hexosa fosfato canalizaría el flujo de carbono hacia acil-fosfato, cuya transformación hacia acetato produce ATP. Un alto nivel del reservorio de acetato intracelular induciría una inhibición en el consumo de etanol (congruente con un bajo nivel de PQQ).

Tabla V.- Resultados de las mediciones en los experimentos en proceso continuo. Las concentraciones en g/L, para los metabolitos en suspensión o en solución y en $\mu\text{mol/g}_{\text{bm}}$, para los metabolitos intracelulares ATP, NAD y PQQ. Los subíndices E, son las concentraciones del etanol; G, de las hexosas; A, del ácido acético; X, de la biomasa, P1, de la celulosa y P2, del polímero hidrofílico. El subíndice a, señala la concentración de los sustratos en la alimentación.

Medio	Estándar	Estándar	Estándar	Estándar	Etanol	Etanol	Etanol	Hexosas	Hexosas	Hexosas
D h^{-1}	.08	.078	.06	.02	.079	.042	.024	.07	.047	.028
C _{Ea}	20	15.7	20	15.7	17	17	17	-	-	-
C _E	-	2.55	12.8	13.5	3.73	.87	2.54	-	-	-
C _{Ga}	44.3	98.2	44.3	98.2	-	-	-	41.7	41.7	41.7
C _G	26.6	89.3	41.2	93.7	-	-	-	2.28	1.69	4.38
C _{Aa}	3.37	3.01	3.37	3.01	2.95	2.95	2.95	3.32	3.32	3.32
C _A	.5	1.12	.71	3.14	2.22	5.29	.37	2.22	3.43	3.32
C _X	.98	1.53	.5	1.63	1.72	1.55	.56	2.28	1.69	4.38
C _{P1}	1.33	.75	1.07	.5	.56	1.06	.56	.5	.625	1
C _{P2}	4.63	3.13	2.3	2.1	2.3	1.2	2.3	2.8	1.7	5.4
ϵ_{PQQ}	-	5.7	12.6	4.4	5	4.5	4	2.8	6.2	2.1
ϵ_{NAD}	59.3	79.6	135.3	63	63	51.2	40	49	146	27
ϵ_{ATP}	10.9	.98	10.9	10.6	1.6	5.1	8.3	6	14.4	15.5

Para una más rápida percepción de la información presentada en la Tabla V, se presentan gráficamente las concentraciones de los metabolitos extracelulares en seguida, según la composición del medio y el tiempo de residencia desarrollado.

Concentraciones en el medio estandar, $D=0.078 \text{ h}^{-1}$

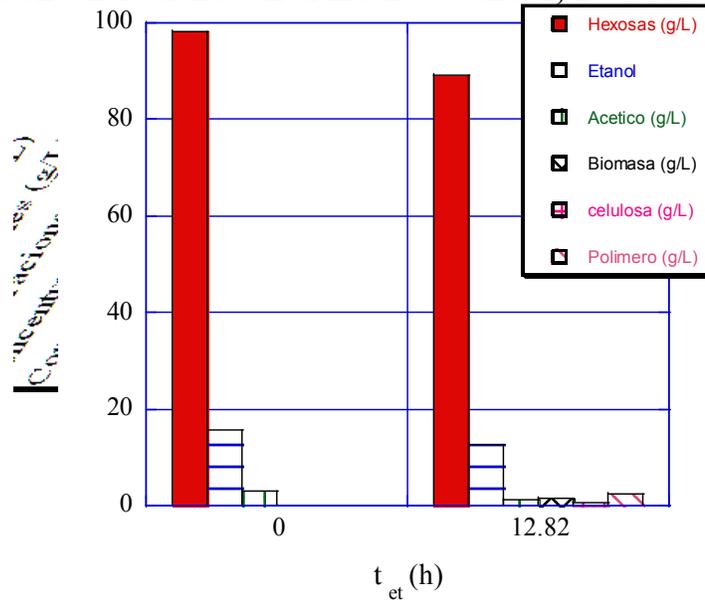


Figura 12.- Gráfica de las concentraciones de las hexosas, del etanol, del ácido acético, de la biomasa, la celulosa y el polímero hidrofílico a la entrada y a la salida del reactor a $D=0.078 \text{ h}^{-1}$, y con alimentación a 98 g/L de hexosas en el medio estándar.

Concentraciones en el medio estandar $D=0.02 \text{ h}^{-1}$

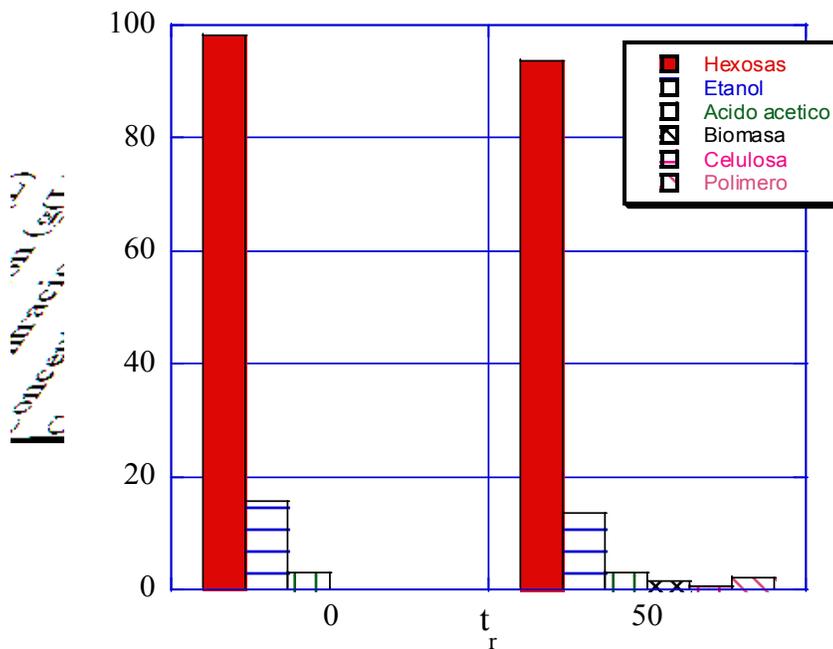


Figura 13.- Gráfica de las concentraciones de las hexosas, del etanol, del ácido acético, de la biomasa, la celulosa y el polímero hidrofílico a la entrada y a la salida del reactor a $D=0.02 \text{ h}^{-1}$, y con alimentación a 98 g/L de hexosas en el medio estándar.

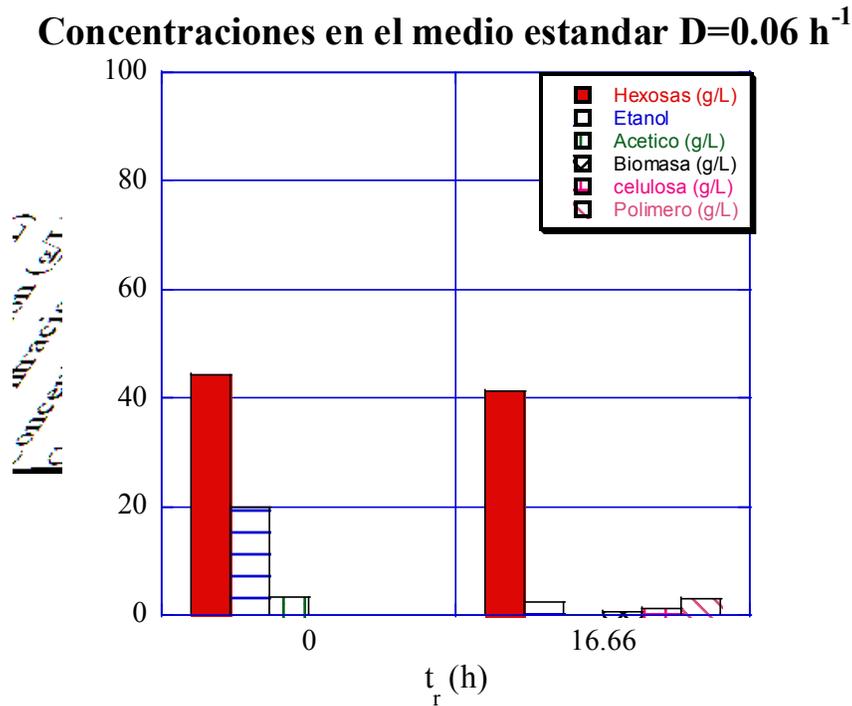


Figura 14.- Gráfica de las concentraciones de las hexosas, del etanol, del ácido acético, de la biomasa, la celulosa y el polímero hidrofílico a la entrada y a la salida del reactor a $D=0.06 \text{ h}^{-1}$, y con alimentación a 42 g/L de hexosas en el medio estándar.

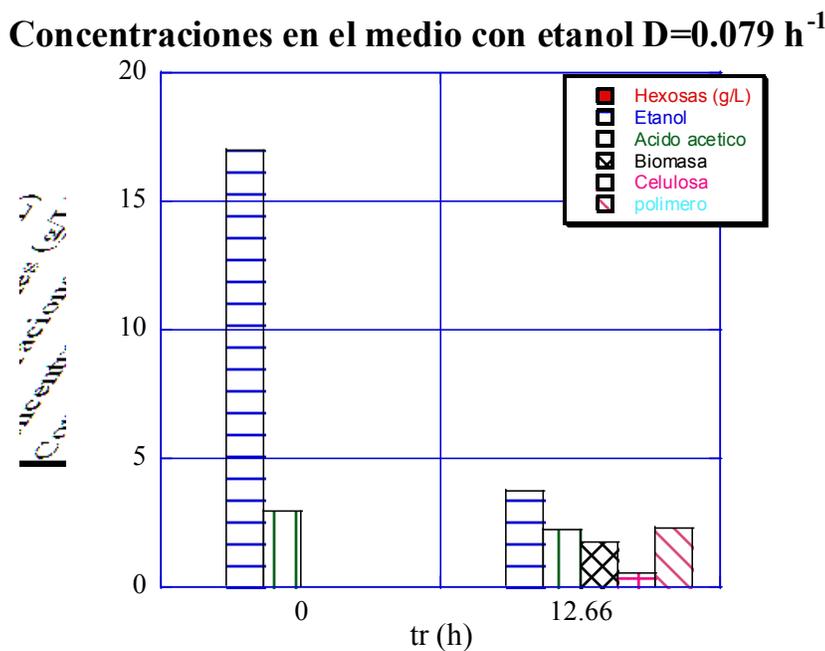


Figura 15.- Gráfica de las concentraciones de las hexosas, del etanol, del ácido acético, de la biomasa, la celulosa y el polímero hidrofílico a la entrada y a la salida del reactor a $D=0.079 \text{ h}^{-1}$, y con alimentación de medio con etanol y ácido acético.

Concentraciones en el medio con etanol $D=0.042 \text{ h}^{-1}$

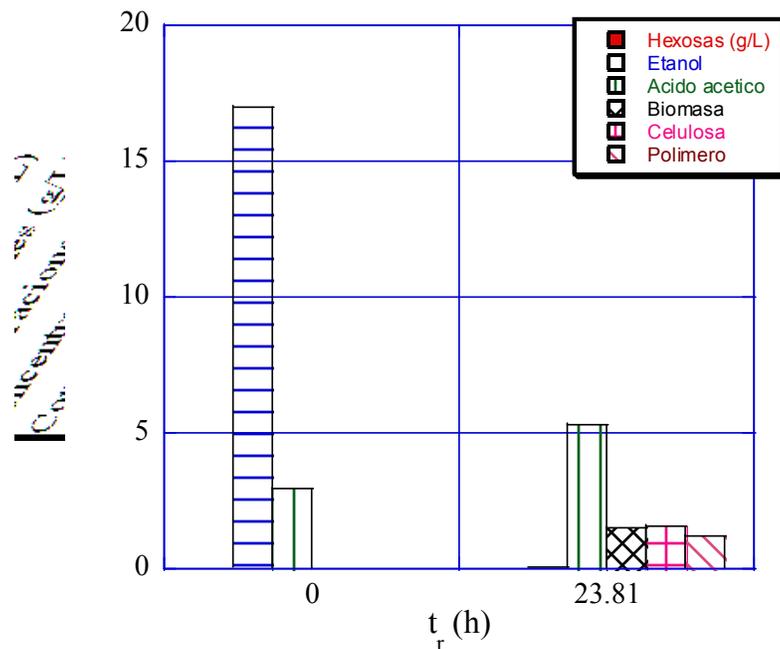


Figura 16.- Gráfica de las concentraciones de las hexosas, del etanol, del ácido acético, de la biomasa, la celulosa y el polímero hidrofílico a la entrada y a la salida del reactor a $D=0.042 \text{ h}^{-1}$, y con alimentación de medio con etanol y ácido acético.

Concentraciones en el medio con etanol $D=0.024 \text{ h}^{-1}$

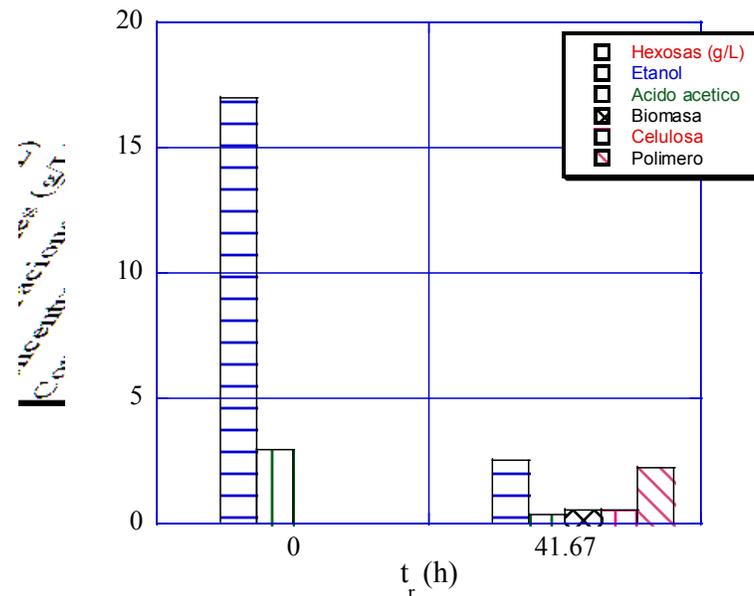


Figura 17.- Gráfica de las concentraciones de las hexosas, del etanol, del ácido acético, de la biomasa, la celulosa y el polímero hidrofílico a la entrada y a la salida del reactor a $D=0.024 \text{ h}^{-1}$, y con alimentación de medio con etanol y ácido acético.

Concentraciones en el medio con hexosas $D=0.07 \text{ h}^{-1}$

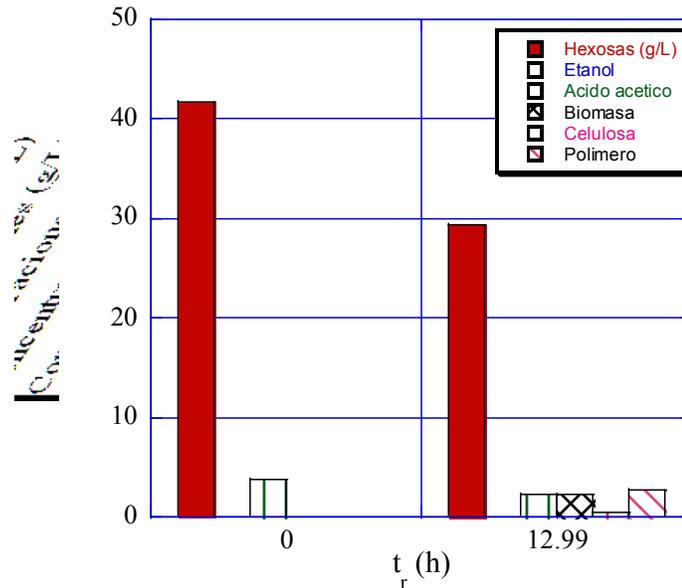


Figura 18.- Gráfica de las concentraciones de las hexosas, del etanol, del ácido acético, de la biomasa, la celulosa y el polímero hidrofílico a la entrada y a la salida del reactor a $D=0.07 \text{ h}^{-1}$, y con alimentación de medio con hexosas y ácido acético.

Concentraciones en el medio con hexosas $D=0.024 \text{ h}^{-1}$

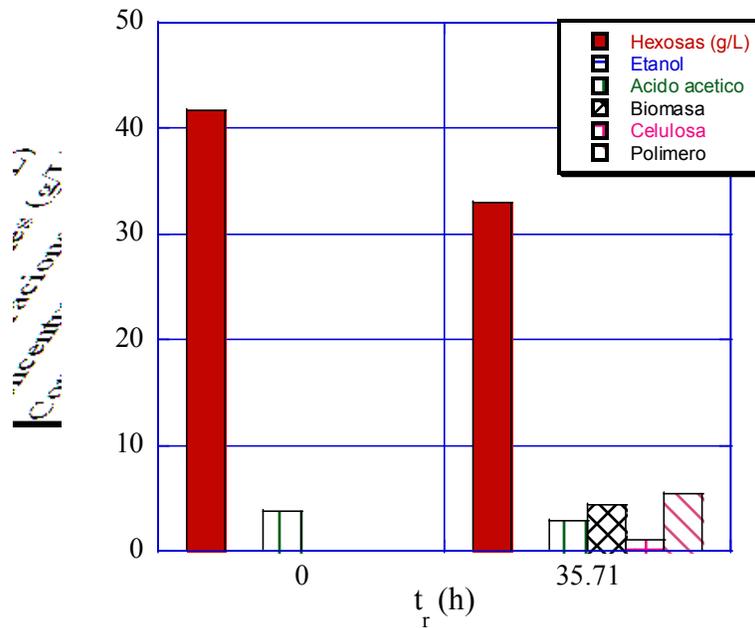


Figura 19.- Gráfica de las concentraciones de las hexosas, del etanol, del ácido acético, de la biomasa, la celulosa y el polímero hidrofílico a la entrada y a la salida del reactor a $D=0.024 \text{ h}^{-1}$, y con alimentación de medio con hexosas y ácido acético.

Las figuras 12 a 19 muestran las concentraciones iniciales y de salida para las especies químicas extracelulares consideradas así como el tiempo de residencia en el reactor para los medios con los que se experimentó. En las figuras 12 y 13 se aprecia la inhibición en la tasa de consumo de etanol en el medio con alta concentración de hexosas en la alimentación, evidente si se compara con el consumo mostrado en la figura 14. Con base en estos valores se calculó la tasa de consumo y producción que se muestra en la Tabla VII.

En seguida se discute los valores de metabolitos intracelulares medidos en nuestros experimentos en relación con las mediciones hechas por otros investigadores.

Analizando el modelo celular de *Saccharomyces cerevisiae* de Galazzo y Bailey (1990), Stephanopoulos, Aristidou y Nielsen resuelven el sistema de reacciones metabólicas y estiman los siguientes niveles de concentración en su interior: ATP, 0.11 g/g y ADP, 0.364 g/g. Informan que en mediciones de metabolitos intracelulares con cultivo de levadura en un bio-reactor continuo después de un pulso de glucosa, la ingesta de glucosa se detecta como un incremento en la concentración intracelular de G6P y la disminución del ATP y aumento paralelo del ADP y el AMP. Las concentraciones de ATP son inicialmente de $8 \mu\text{mol}/g_{\text{bm}}$, ($\sim 190 \mu\text{mol ATP g mol } C_{\text{bm}}^{-1}$, en nuestra forma de informar la concentración intracelular), y las de ADP y AMP son de 1 y $0.3 \mu\text{mol}/g_{\text{bm}}$ respectivamente. (Ver la Tabla VI).

Mauch y col. (en Schügerl y Bellgardt, 2000) cultivan a *S. cerevisiae* en un reactor continuo, alimentado con glucosa a $D= 0.1 \text{ h}^{-1}$. Mediante un sistema de análisis por inyección de flujo miden el nivel intracelular de metabolitos clave de la glicolisis, así como la concentración en el medio de la glucosa y de varios productos. El microorganismo consumió glucosa a una tasa de $16.7 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Entonces añaden un pulso de glucosa que eleva la concentración de ésta en el reactor dos órdenes de magnitud. En los siguientes segundos el consumo de glucosa aumenta a $40 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, en tanto que el nivel de ATP desciende de 8 a $5 \mu\text{mol } g_{\text{biomasa}}^{-1}$ y vuelve a aumentar en 2 minutos hasta $\sim 6.5 \mu\text{mol } g_{\text{bm}}^{-1}$. (en las unidades que informamos, $123 - 197 \mu\text{mol ATP g mol } C_{\text{bm}}^{-1}$). Mauch y col. encontraron la relación compleja, biunívoca, entre tasa de consumo y nivel de metabolito intracelular. (Ver apéndice A.2).

Gikas (1996) midió la concentración de ATP en células de *Beneckea natriegens*. En la Tabla VII, se muestra los valores que Gikas y otros investigadores encontraron para esta concentración y, en su caso, la especie o especies investigada(s).

Cortassa y col. (2004, p209) refieren experimentos también en estado estacionario con diversas mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*, en los que midieron las concentraciones intracelulares de varios metabolitos clave, incluyendo los adenosín fosfatos. Las concentraciones de ATP se expresan en mmol/L de volumen intracelular. Los valores máximo de 4.68 y mínimo de 0.79 del trabajo citado y que se muestran en la Tabla VI, equivalen aproximadamente a .0026 y 0.0004 g/g lo que es compatible con los valores que se informan en el presente trabajo.

La concentración de ATP varía según el estado metabólico del microorganismo y en la Tabla VI, el rango de variación es de 70 veces. Los resultados del trabajo presente se encuentran dentro de este rango.

Tabla VI.- Valores de ATP intracelular según diversos investigadores. (* en Gikas, 1996; ** en Bellgardt, 2000)

Trabajo	ϵ_{ATP} (g/g)	Microorganismo(s)
Ali y col.*	0.0001 – 0.0004	Lodos activados
Gikas y Livingston*	0.0005 – 0018	Diversas bacterias
Höfle*	0.00125	<i>Cytophaga johnsonae</i>
Holm-Hansen y Booth*	0.001 – 0.002	Bacterias marinas
Jorgensen y col.*	0.0022 - 0.0037	Lodos activados
Lehninger*	0.003	
Levin y col.*	0.0016 - 0.0077	“
Nelson y Lawrence*	0.0025	“
Roe y col.*	0.0055	“
Strange y col.*	0.001 – 0.002	<i>Aerobacter aerogenes</i>
Syrett*	0.002	<i>Chlorella</i> sp.
Upadhyaya y Eckenfelder*	0.0005- 0.001	Lodos activados
Weddle y Jenkins*	0.001 – 0.0015	“
Velasco-Bedrán	0.0005 – 0.014	<i>Gluconacetobacter entanii</i>
Cortassa y Aon, 2002	0.0004 – 0.0026	<i>S. cerevisiae.</i>
Mauch y colaboradores**	0.0044	
Verduyn y col., 1992	0.0006 - 0.0022	<i>S. cerevisiae</i>

Con respecto a la pirroloquinolín quinona, Urakami y colaboradores (1992) informaron del efecto de diversas sales sobre la producción de PQQ, encontrando una concentración intracelular de 0.016 a 0.021 g/g a diversas concentraciones de Mg. Estos se encuentran un orden de magnitud más altos que los detectados en este estudio.

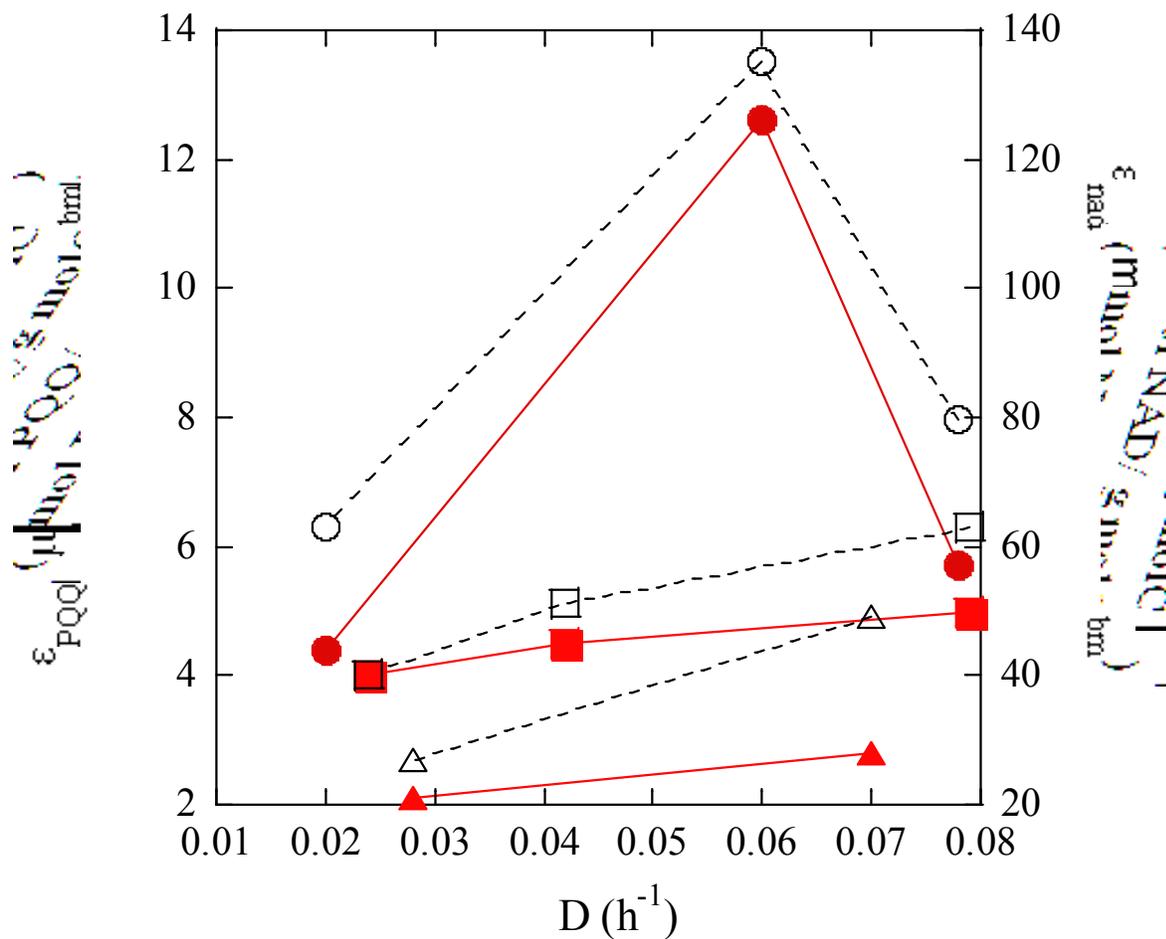


Figura 20.- Concentraciones intracelulares de los cofactores de redox (PQQ y NAD, $\mu\text{mol g molC}_{\text{bm}}^{-1}$) en diferentes medios de cultivo, versus la tasa de dilución, h^{-1} . (NAD: ○, medio estándar; △, hexosas; □, etanol. PQQ: ●, medio estándar; ▲, etanol; ■, hexosas).

Relacionando las tasas específicas de producción o consumo informadas en la Tabla VII, con los niveles intracelulares de los metabolitos medidos, podemos en primer lugar observar (Figura 20) el comportamiento de los niveles de los cofactores de óxido-reducción (NAD y PQQ) con respecto a la tasa de dilución y las diferentes composiciones del medio de cultivo. Se observa el efecto de la inhibición por alta concentración de sacarosa en el medio, (referido párrafos atrás). Se observa además que los mínimos niveles de la PQQ se presentan en el medio que sólo contiene ácido acético y sacarosa, pues en la red metabólica involucrada en este caso, la PQQ no interviene (ver Figura 10).

Tabla VII.- Tasas específicas de reacción en el medio estándar, en el medio con etanol y ácido acético como fuente de carbono y en el medio con sacarosa y ácido acético como fuente de carbono. μ es la tasa específica de consumo (la tasa volumétrica de consumo o producción medidos en el reactor dividida entre la concentración de biomasa). E, es el etanol, G es la glucosa, A, es el ácido acético X es la biomasa, P1 es la celulosa y P2 es el polímero hidrofílico ($\text{g mol C del metabolito g molC}_{\text{bm}}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

Medio	$\mu_E \pm$ 4.5%	$\mu_G \pm$ 4.5%	$\mu_A \pm$ 4.5 %	$\mu_{X\pm}$ 10%	μ_{P1}	μ_{P2}
Estándar	n. d.	-1.1848	-0.1900	0.0800	0.0872	0.3037
“	0.0208	-0.3721	-0.0760	0.0780	0.0480	0.1458
“	-2.1244	-0.3050	-0.2559	0.0600	0.0526	0.1540
“	0.0000	-0.0453	-0.0034	0.0200	0.0082	0.0344
Etanol	-0.6033	0	-0.0222	0.0790	0.0363	0.1490
“	-0.4538	0	0.0660	0.0420	0.0365	0.0413
“	-0.1868	0	-0.2324	0.0240	0.0110	0.0453
Sacarosa	0	-0.3092	-0.0360	0.0700	0.0287	0.1596
“	0	-0.0456	-0.0027	0.0280	0.0230	0.1240

En la figura 21, es claro que el nivel de PQQ está relacionado antes que con la velocidad de crecimiento, con la velocidad de consumo de etanol. La Figura 21 muestra las concentraciones intracelulares de PQQ contra las velocidades específicas de consumo de etanol para los tres medios empleados en los experimentos continuos. Los valores más bajos son para el medio con sacarosa como fuente de carbono (en cuyo catabolismo el PQQ no interviene). En el medio estándar se muestran la mayor velocidad de consumo de etanol y la mayor concentración de PQQ. En el medio con etanol y ácido acético las tasas de consumo de etanol fueron menores que en el caso anterior, pero se muestra una correlación positiva entre el consumo de etanol y el contenido de PQQ.

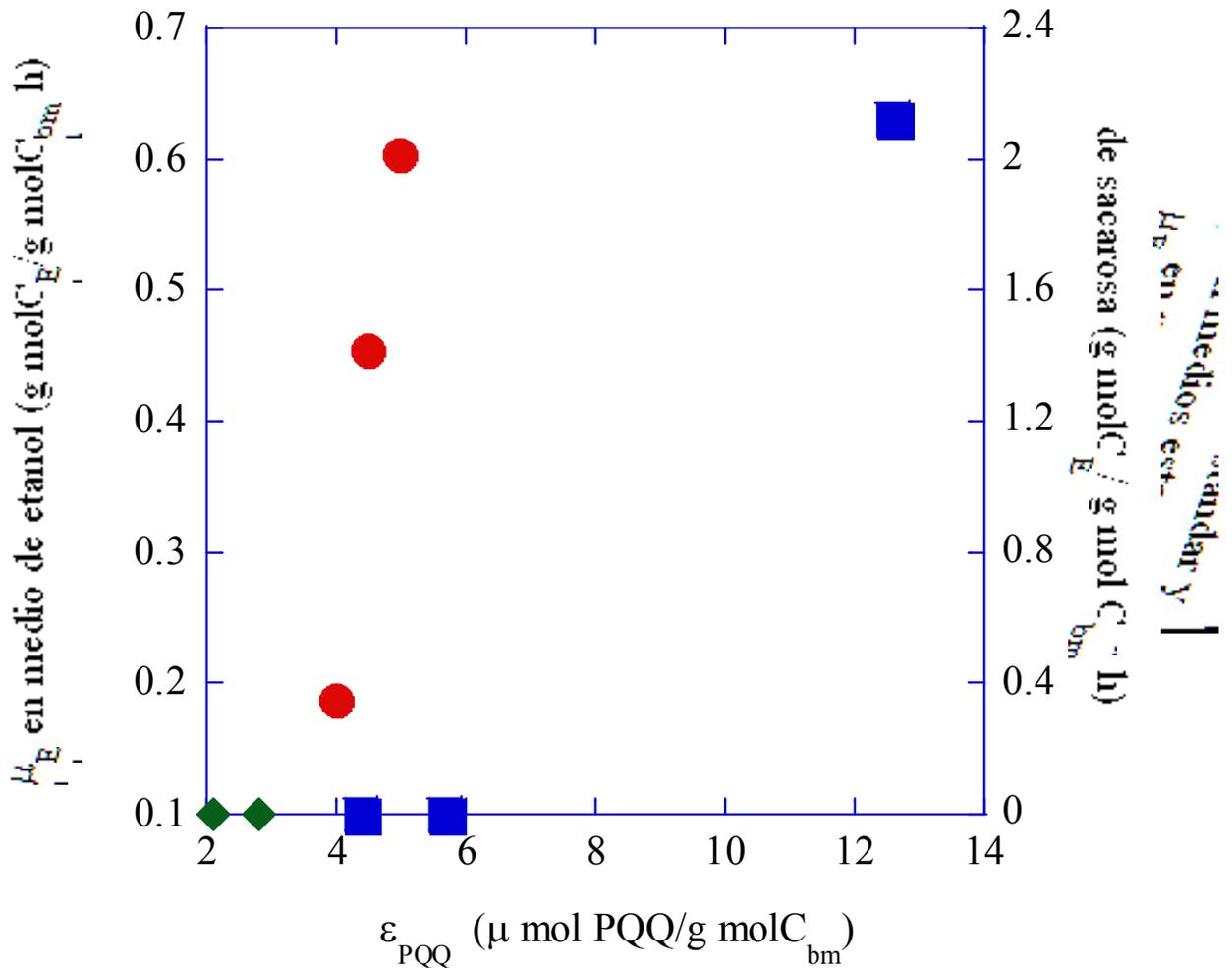
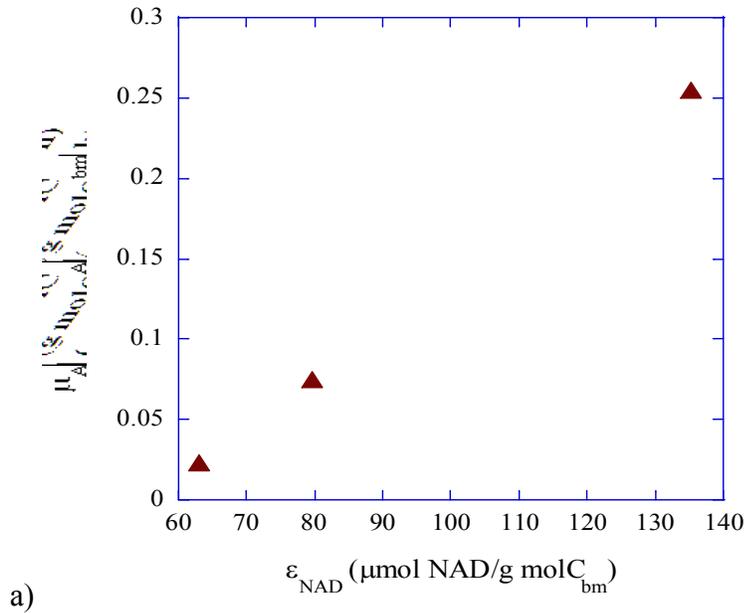


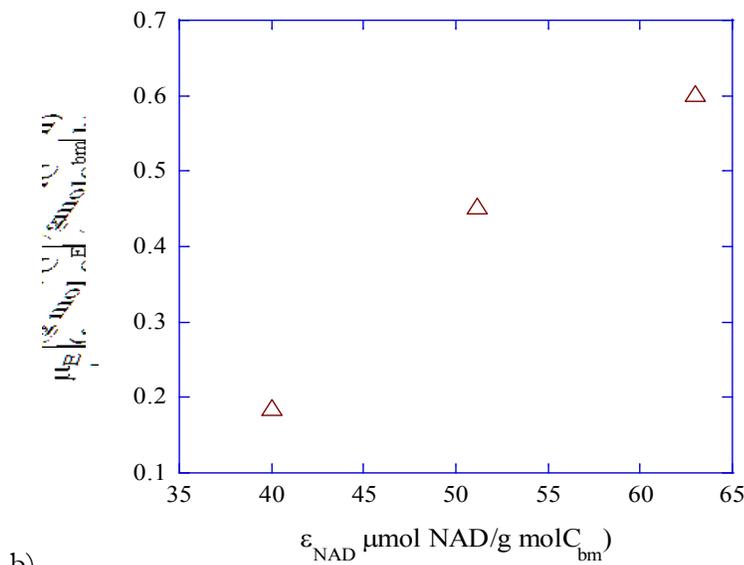
Figura 21.- Tasa específica de consumo de etanol μ_E en el medio **estándar** (■), con **etanol** (●) y con **sacarosa** (◆) ($\text{g mol C}_{\text{etanol}} \text{ g mol C}_{\text{biomasa}}^{-1} \text{ h}^{-1}$) versus las concentraciones intracelulares de PQQ ϵ_{PQQ} ($\mu\text{mol PQQ g molC biomasa}^{-1}$).

El otro cofactor de óxido-reducción observado, el NAD, tiene un papel más versátil en el metabolismo, lo que se refleja en que sus niveles intracelulares son un orden de magnitud mayores que los de PQQ. En la mayoría de los casos la fuente alterna de carbono fue el ácido acético, además de la sacarosa. Suponemos que la más significativa fuente de NADH se relacionará con la síntesis de biomasa, ligada al CAT. El nivel de NAD intracelular está en efecto relacionado con la velocidad de consumo de ácido acético en el medio estándar, como se observa en la Figura 22. En el medio de etanol y ácido acético los datos experimentales muestran un máximo y una baja concentración de

NAD a la mayor velocidad de consumo de acético. En el medio con sacarosa y ácido acético la concentración de NAD no se correlaciona con el consumo de ácido acético.



a)



b)

Figura 22 a y b.- a) Tasa específica de consumo de ácido acético (μ_A , $\text{g mol C}_{\text{ácido acético}} / \text{g mol C}_{\text{biomasa}} \text{ h}^{-1}$) en el medio estándar (\blacktriangle). b) Tasa específica de consumo de etanol (μ_E , $\text{g mol C}_{\text{etanol}} / \text{g mol C}_{\text{biomasa}} \text{ h}^{-1}$) en el medio con etanol (Δ) versus la concentración intracelular del NAD ϵ_{NAD} ($\mu\text{mol NAD} / \text{g mol C}_{\text{biomasa}}$).

El nivel del NAD en el medio estándar, no se correlaciona con el consumo de etanol (como resultado del fenómeno de inhibición por alta concentración de sacarosa), sino con el del ácido acético. Según nuestro esquema el NAD se consume en la gluconeogenesis, la síntesis del polisacárido hidrofílico y en el anabolismo (Figura 22 a).

Por eso, en el medio con ácido acético y etanol, el nivel de NAD se correlaciona con el consumo del etanol que es la principal fuente de carbono que alimenta el metabolismo (Figura 22 b).

Sin embargo, en la gráfica de la Figura 23 se muestra una relación del nivel intracelular de NAD con la velocidad de consumo de glucosa. Una mirada al esquema de la Figura 26 ayudará a visualizar la ruta metabólica empleada en este caso.

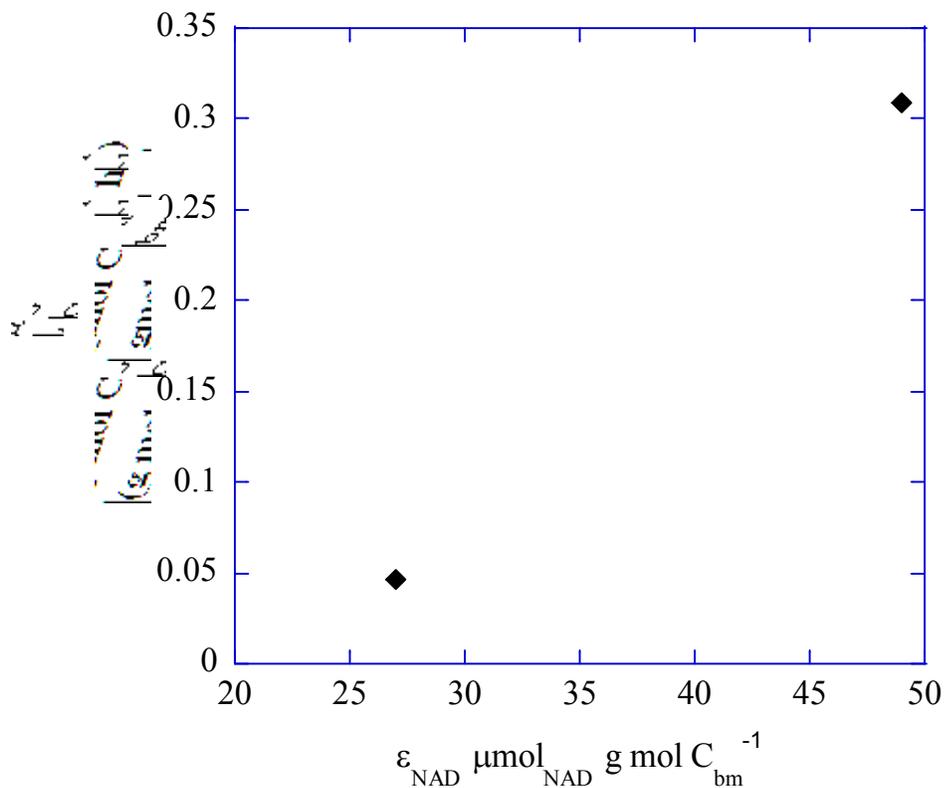


Figura 23.- Tasa específica de consumo de glucosa, μ_G , para el medio de hexoses (\blacklozenge) ($\text{gC mol glucosa gC mol biomasa}^{-1} \text{ h}^{-1}$) versus la concentración intracelular del NAD ϵ_{NAD} ($\mu\text{mol NAD gC mol biomasa}^{-1}$).

La ecuación 55 establece el balance de r_{ATP} en términos de las tasas observables por estar ligadas al consumo de especies presentes en el medio de reacción o de productos metabólicos que aparecen en éste y que son por ello medibles. La ecuación establece la producción y el consumo del ATP como resultado de esas reacciones e incorpora su generación por fosforilación oxidativa, por lo que establecemos la siguiente ecuación de conservación con respecto al ATP en el biorreactor (ver figura 11):

$$\text{Acumulación} = \text{entrada} \text{ más } \text{reacción} \text{ menos } \text{salida}.$$

En el caso de no haber acumulación y considerando que no hay alimentación de biomasa (o de ATP) al reactor, la tasa de reacción del ATP en el interior de la fase biótica del reactor será igual a la salida del ATP con la fase biótica en la salida del biorreactor:

$$r_{ATP} C_X = DC_X \epsilon_{ATP}. \quad (56)$$

pero r_{ATP} está dada por la ecuación 55,

$$\begin{aligned} r_{ATP} = & \left(3 \frac{P}{O} - \frac{9}{2} \right) r_E + \left(2 \frac{P}{O} - \frac{9}{2} \right) r_A + \left(2 \frac{P}{O} - \frac{25}{6} \right) r_G \\ & - \left(Y - 4.4 - 2.1 \frac{P}{O} \right) r_X - \left(2 \frac{P}{O} - 3.83 \right) r_{P1} - \left(1.893 \frac{P}{O} - 3.83 \right) r_{P2} \end{aligned}$$

de donde estimamos el valor de ϵ_{ATP} empleando ese balance y las tasas específicas calculadas a partir de las mediciones experimentales, y la tasa de dilución.

$$\begin{aligned} \epsilon_{ATP} = & \left(3 \frac{P}{O} - \frac{9}{2} \right) \frac{r_E}{D} + \left(2 \frac{P}{O} - \frac{9}{2} \right) \frac{r_A}{D} + \left(2 \frac{P}{O} - \frac{25}{6} \right) \frac{r_G}{D} \\ & - \left(Y - 4.4 - 2.1 \frac{P}{O} \right) - \left(2 \frac{P}{O} - 3.83 \right) \frac{r_{P1}}{D} - \left(1.893 \frac{P}{O} - 3.83 \right) \frac{r_{P2}}{D} \end{aligned} \quad (57)$$

Un valor de 1.58 para la relación P/O está en el rango de los valores observados en los microorganismos, según De Faveri (De Faveri y col., 2003, con *Acetobacter bansenii*, [sic]) y Roels (1985), y un valor de $Y_{ATP} = 3$ (de 2.5 para las tasas de dilución más bajas) es asimismo usual.

Los valores de ϵ_{ATP} estimados con los valores de los parámetros arriba mencionados, las tasas medidas experimentalmente y la ecuación 57, se comparan con los medidos experimentalmente lo que se muestra en la Figura 24. Se observa que la tendencia de los datos es a disminuir con el

aumento en la tasa de dilución.. El ajuste es menor para las tasas de dilución más bajas (menores velocidades de crecimiento) en cuyos estados fisiológicos es razonable suponer un mayor impacto de el consumo de ATP para mantenimiento (lo cual no se consideró en el esquema de las reacciones metabólicas). El mejor ajuste se presenta en el medio con etanol y acético, cuyo encadenamiento de las reacciones metabólicas se esquematiza en la Figura 24

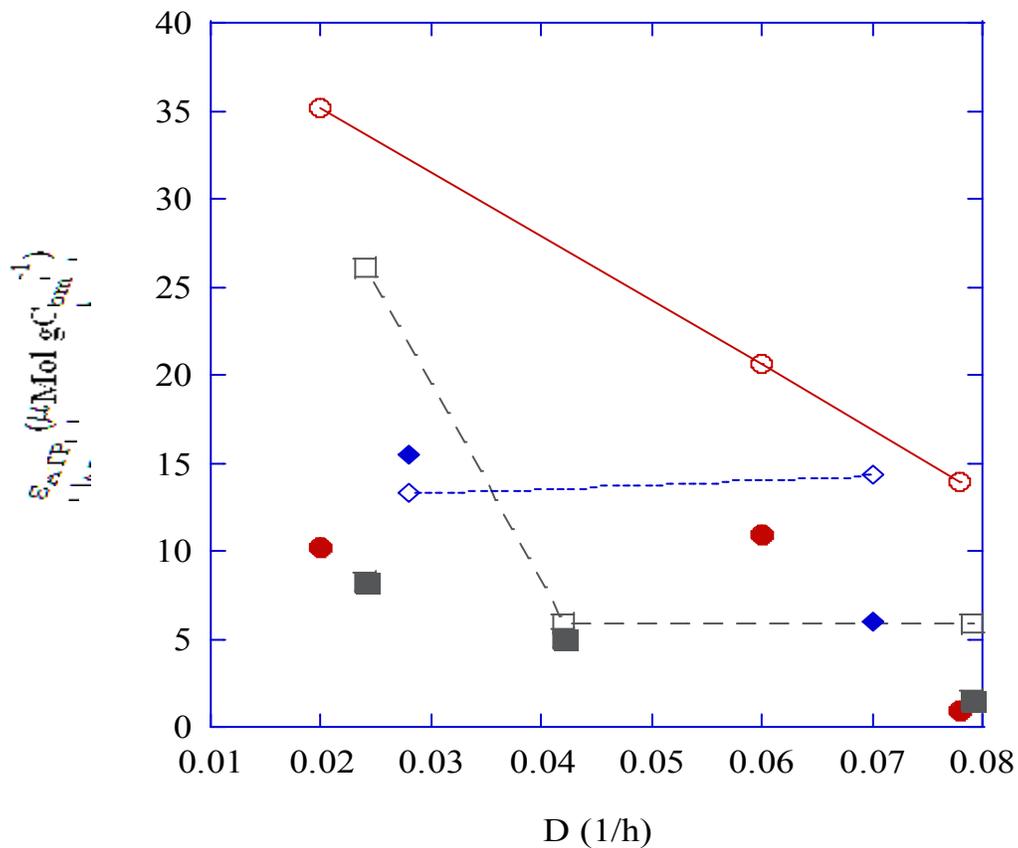


Figura 24.- Nivel del ATP intracelular ($\mu\text{mol ATP g mol } C_{\text{biomasa}}^{-1}$) medido en los medios estándar (●), con etanol (■) y con hexosas (◆) y las concentraciones estimadas de ATP en los medios estándar (○), con etanol (□) y hexosas (◇) versus la tasa de dilución (h^{-1}).

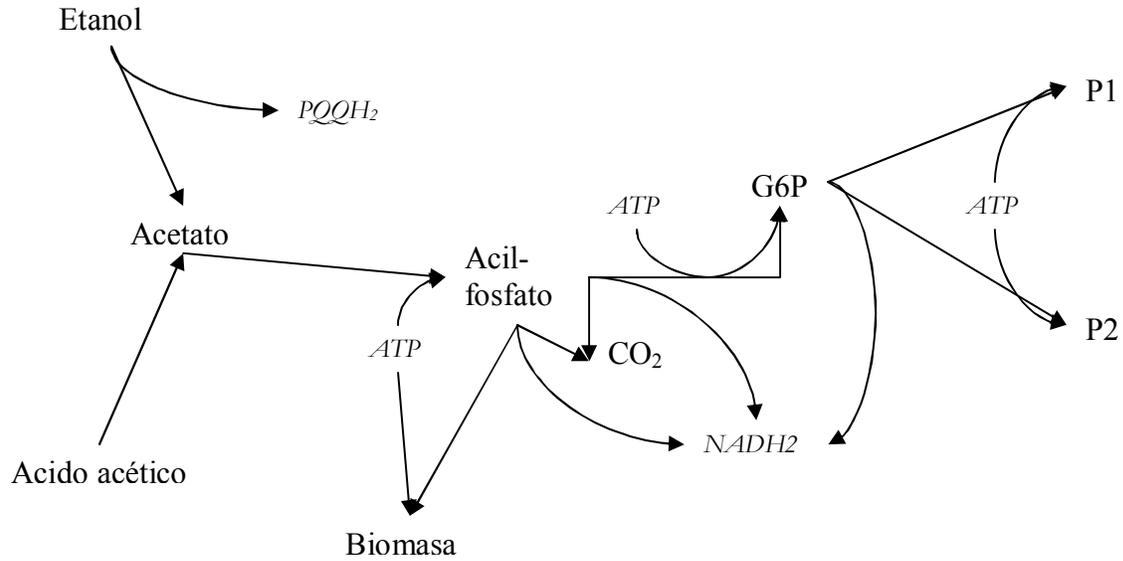


Figura 25.- Esquema de la ruta metabólica en el medio con etanol y acético como fuentes de carbono

En el medio estándar, los valores de mayor y menor tasa de dilución corresponden a los experimentos en los cuales se muestra una inhibición del crecimiento y quizás, un mayor efecto del consumo de ATP para mantenimiento. Los valores estimados de ATP intracelular presentan mayor discrepancia en el medio con sacarosa como fuente de carbono.

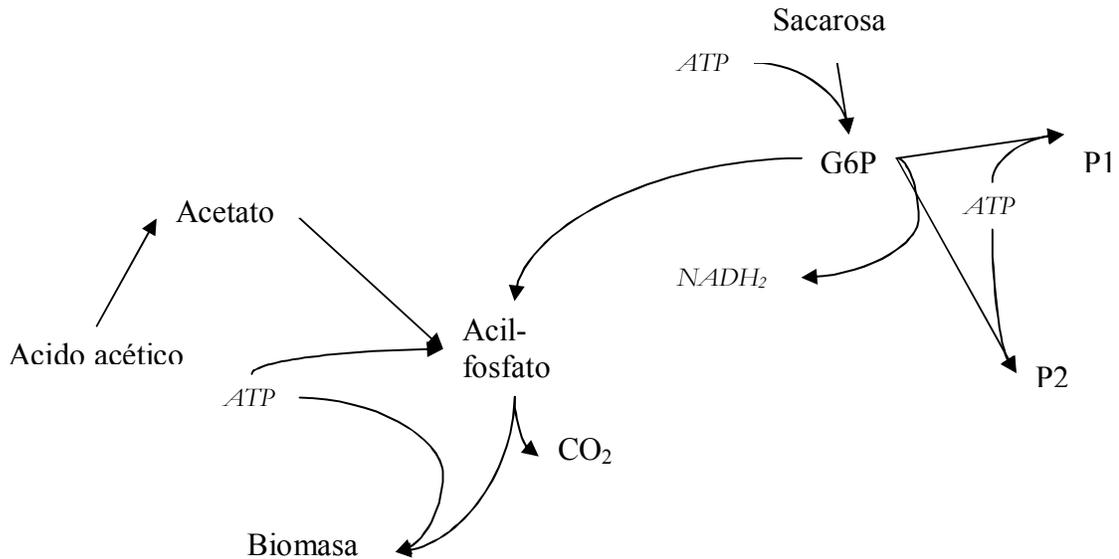


Figura 26.- Esquema de la red metabólica con sacarosa y ácido acético como fuentes de carbono.

Esta forma del metabolismo se esquematiza en la Figura 26 y aquí resalta la importancia del reservorio de acil-fosfato, que es un metabolito singular por su papel tanto como un nodo importante en el flujo de carbono, como en el flujo de compuestos “activos”, pues su energía libre es inclusive mayor que la del ATP (Wolfe, 2005).

V.2.3.- De los experimentos por lote.

Se realizó tres experimentos en modo intermitente durante 40 h de proceso, en reactores con las mismas características que los empleados para el proceso continuo. La composición del medio incluyó acético (aproximadamente 2 g/L) y sacarosa (con una concentración inicial aproximada de 30 g/L) y una dotación reducida de etanol (aproximadamente 2.5 g/L); la temperatura se mantuvo a 30 °C, y la aireación a 0.3 vvm. Los resultados se muestran en las Figuras 27 a y b.

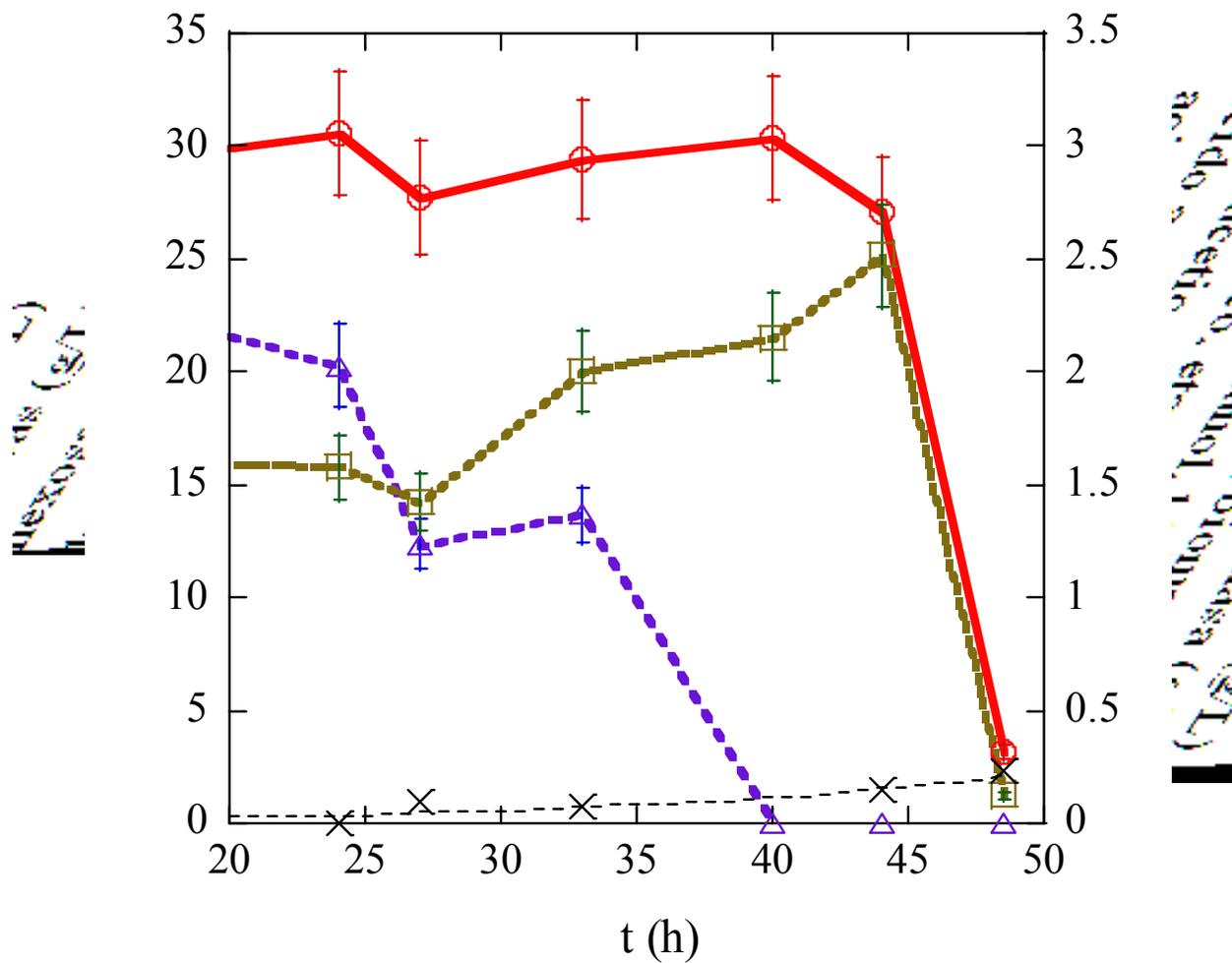
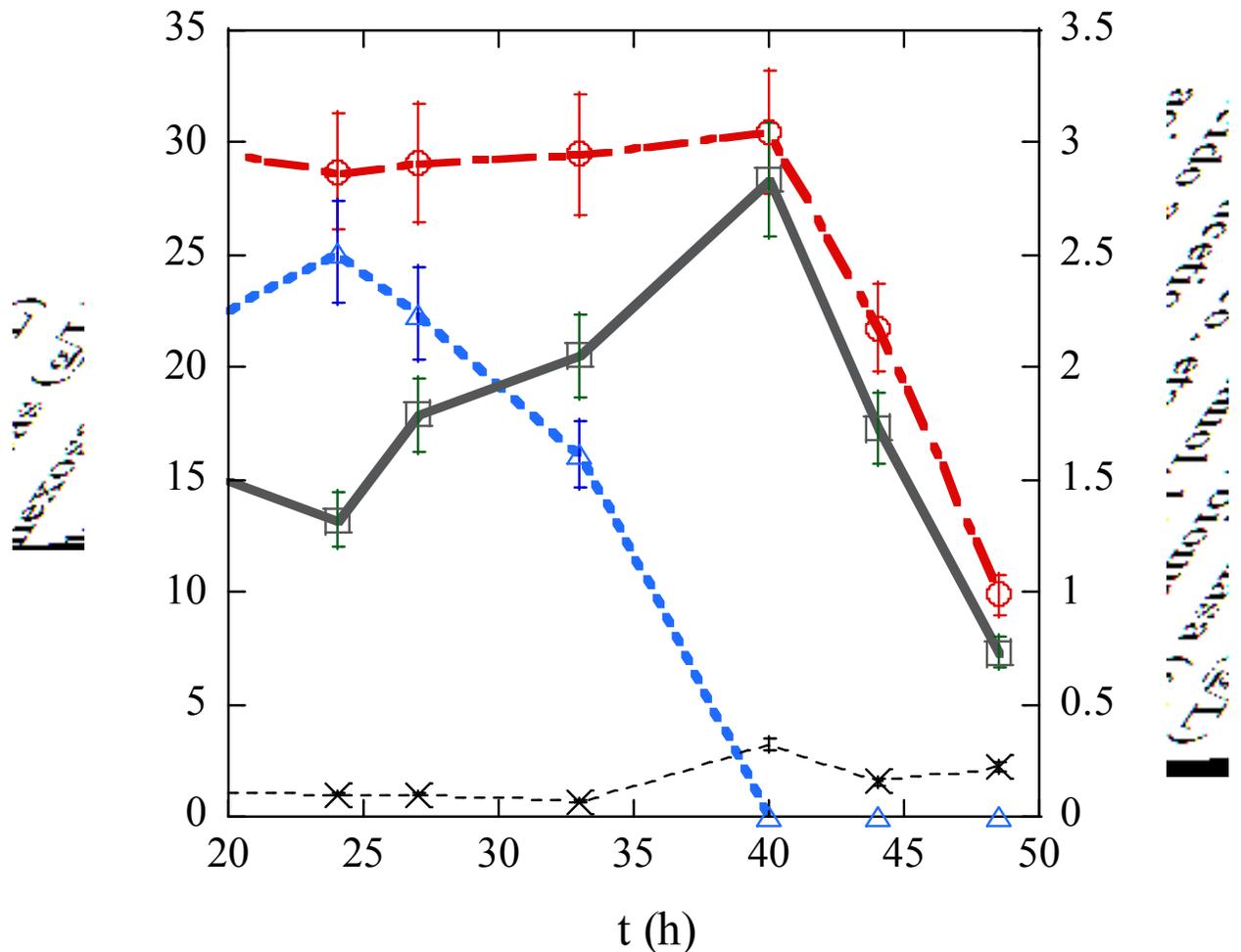


Figura 27 a).- Proceso por lote de *Gluconacetobacter entanii* con glucosa (30 g L^{-1}) y a baja concentración inicial de etanol ($\sim 2 \text{ g L}^{-1}$) a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ y 0.3 vvm de aireación. Concentraciones de O_2 , glucosa; Δ , etanol, \square , ácido acético y \times , biomasa.



Figuras 27 b).- Proceso por lote de *Gluconacetobacter entanii* con glucosa (30 g L^{-1}) y a baja concentración inicial de etanol ($\sim 2 \text{ g L}^{-1}$) a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ y 0.3 vvm de aireación. Concentraciones de \circ , glucosa; Δ , etanol; \square , ácido acético y \times , biomasa. a) and b) son experimentos independientes.

El microorganismo muestra un comportamiento diáuxico con consumo inicial de etanol, producción de ácido acético, pero sin consumir la sacarosa. El metabolismo entonces se encadenó de la forma esquematizada en la Figura 25, esto es, como los experimentos en reactor continuo con el medio de ácido acético y etanol.

Cuando el etanol se agota en el medio, inicia el consumo de sacarosa y, paralelamente, de ácido acético. El metabolismo ahora se articula como se muestra en la Figura 26, de manera semejante a los experimentos continuos con el medio de hexosas y ácido acético.

Al igual que como se analiza más adelante en los experimentos de Kornmann (Kornmann y col., 2003b), la diauxia se presenta porque en el balance energético, el consumo de ATP (o de acil-fosfato) es menor con el catabolismo de etanol (no se requiere para la incorporación del etanol, pero sí se genera PQQH₂, que regenerará ATP) que con el de hexosas (que consumen ATP para incorporarse a la célula, pero no sufren oxidación y por ende no generan cofactor reducido).

La ecuación de conservación del acil-fosfato es en general:

$$\mu_{A\sim P} = \mu_3 - \frac{11}{10}\mu_X - \frac{4}{3}\mu_5 \quad (58)$$

Empleando las ecuaciones 50 a 53 y los esquemas de las Figuras 16 y 17, la conservación de acil-fosfato es en la primera fase de la diauxia:

$$\mu_{A\sim P} = \mu_{P1} + \mu_{P2} - \mu_5 \quad (59)$$

y durante la segunda fase:

$$\mu_{A\sim P} = \mu_{P1} + \mu_{P2} - \mu_5 - \mu_G \quad (60).$$

Lo expresado en un párrafo previo encuentra una expresión más sintética en las ecuaciones 59 y 60. La relevancia de estas ecuaciones reside en el papel importante que el acil-fosfato revela tener según el presente análisis y que ameritará analizar en trabajo futuro.

Otros investigadores realizaron experimentos por lote. Por ejemplo, Kornmann y col. (2003a), trabajando con *Gluconacetobacter xylinus*, encuentran que la producción de acetán es mayor en un medio de cultivo con glucosa. Sin embargo una buena parte de esa glucosa (23 g de los 40 iniciales) se oxida a ácido glucónico. El medio de cultivo empleado por estos investigadores no contuvo etanol. Sin embargo ellos encuentran que la adición de etanol al medio de cultivo inhibe la velocidad de producción de biomasa y miden una disminución en la actividad de la ruta de la fosfo transacetilasa y de la acetato cinasa, (lo que implica una inhibición del consumo de etanol, lo que no está claro en la publicación que se comenta, o una acumulación de acetato, ya sea en el medio o en el reservorio intracelular). Encuentran también una diauxia si se alimenta el medio con ácido acético, el cual es consumido preferentemente con producción de CO₂. Tras agotar el acético, el microorganismo consume la glucosa, aunque su tasa de crecimiento es menor.

Shigematsu y col. (2005) desarrollaron una mutante de *Gluconacetobacter xylinus* deficiente en el gen para la síntesis de la glucosa deshidrogenasa, buscando mejorar la síntesis de celulosa al evitar el uso de la G6P para sintetizar ácido glucónico. Si bien la cepa GDH- produjo mayor cantidad de celulosa que la cepa control y con mayor rendimiento sobre glucosa (4.13 g/L versus 2.58 g/L y 0.1

versus 0.06), la velocidad de consumo de glucosa y de crecimiento fueron menores. Los autores explican la baja velocidad de consumo de glucosa como “quizás debida a una baja capacidad para el consumo de glucosa”. En un medio con fructosa como fuente de carbono, no hallaron diferencias en la producción de celulosa. Naritomi y col. (1998) encontraron que un medio de cultivo de Agua de Cocimiento de Maíz y fructosa suplementado con etanol (10 g/L), mejoraba la tasa de consumo de fructosa, la velocidad de crecimiento y la de producción de celulosa, debido a niveles mayores de ATP y de fructosa hexocinasa, aunque una concentración de etanol de 15 g L⁻¹ inhibió el proceso.

Ishida y col. (2003), interesados en la producción de celulosa, hacen crecer a una cepa mutante de *Gluconacetobacter xylinus* deficiente en la producción de acetán, en un medio sólo con fructosa como fuente de carbono y encuentran que disminuye la producción de celulosa y del crecimiento. Los investigadores lo atribuyen a problemas de esfuerzo de corte en los reactores agitados con los que experimentaron. Sin embargo, un análisis que considere no sólo el flujo de carbono, sino asimismo el de la generación de cofactores de óxido-reducción nos conduce a ver que la síntesis de acetán implica la generación de NADH, que conduce a la producción de ATP cuando aquél se reoxida en la cadena respiratoria. En ese medio, la ingesta de fructosa implica gasto de ATP así como la síntesis de celulosa; la síntesis de biomasa produce NADH, pero asimismo consume ATP. La síntesis de acetán quizás mejore la resistencia de la partícula al esfuerzo de corte en los fermentadores, pero sin duda mejora el balance energético del metabolismo de *Gluconacetobacter* sp.

Krystynowicz y col (2002) investigan la producción de celulosa por *Gluconacetobacter xylinus* en un medio con glucosa y hallan asimismo que la adición de etanol al medio de cultivo incrementa el crecimiento celular. La razón es similar: la ingesta de glucosa consume ATP (no así la del etanol) y no genera cofactor reducido (lo que sí acontece al ingresar etanol). El balance energético es más favorable al consumir etanol.

Keshk y col. (2005) probaron también en experimentos por lote, la producción de celulosa en diversos medios. Pese a que trabajaron con *Gluconacetobacter xylinus*, en sus experimentos separan y pesan todos los polímeros extracelulares (no sólo la celulosa), informando el resultado como celulosa, y encuentran un rendimiento con gliceraldehído 50% mayor que el de la glucosa como únicas fuentes de carbono. En sus experimentos con glucosa el pH sufre una caída pronunciada, lo que no sucede en el caso del glicerol (o el inositol o la fructosa), lo que se explicaría por la oxidación periplásmica de la glucosa, a ácido glucónico, por la cepa empleada.

VI.- Conclusiones y perspectivas

Se presenta por primera vez el comportamiento del metabolismo íntegro de *Gluconacetobacter entanii* en procesos continuo y por lote, al crecer en medios que contienen sacarosa, ácido acético y etanol, o sólo ácido acético y etanol, o sólo ácido acético y sacarosa. Asimismo, este trabajo presenta por primera vez capacidades metabólicas no informadas previamente para *Gluconacetobacter entanii*, como son la síntesis de celulosa y de un polisacárido hidrofílico, presumiblemente acetán.

En el trabajo se encontró que en el proceso continuo e independientemente de las fuentes de carbono, en todos los casos se produjo celulosa y un polisacárido hidrofílico.

En proceso intermitente y con baja concentración inicial de etanol, se encontró un comportamiento diáuxico atípico pues es generalizada la preferencia por glucosa sobre otras fuentes de carbono, en tanto que en nuestros experimentos la fuente de carbono preferida fue el etanol.

El empleo de la bioquímica genérica de *Gluconacetobacter* spp es útil para interpretar los hallazgos en los experimentos en cultivo continuo e intermitente de *Gluconacetobacter entanii*, así como para analizar los resultados experimentales de los investigadores que han trabajado con otras especies del género.

En particular, se muestra el funcionamiento del metabolismo íntegro de esta especie, contrariamente a lo expuesto en los trabajos de Kornmann (2003) y de Shigematsu (2005) quienes han postulado un metabolismo compartimentado en rutas de glicolisis superior (catabolismo del etanol) e inferior (catabolismo de la glucosa). Nuestro trabajo muestra como ésta visión es sólo una de las múltiples posibilidades que el metabolismo íntegro de *Gluconacetobacter entanii* presenta.

El trabajo que se presenta incluye un modelo estequiométrico bajo el supuesto de homeostasis en el metabolismo (estado cuasi-estacionario en la concentración de los metabolitos intermediarios de la bioquímica del microorganismo). El modelo puede resolverse para analizar la tasa metabólica de la producción y consumo del ATP en las reacciones agrupadas que describen el funcionamiento del microorganismo. En este modelo las reacciones fútiles, que integran el metabolismo de “mantenimiento” para el ATP, no son consideradas.

El modelo presentado se empleó para comparar las mediciones del nivel de ATP con las estimaciones que el modelo predice usando las velocidades de consumo y producción experimentales. Con este ejercicio se logró una proximidad de orden de magnitud.

El modelo estequiométrico se empleó asimismo para analizar los resultados experimentales de investigadores que emplean ésta u otras especies del género. El modelo es útil por hacer énfasis en el flujo tanto de carbono como de potencial de óxido-reducción, clave para la economía energética

del microorganismo. Se muestra así que las técnicas de ingeniería genética deben considerar no sólo el flujo de carbono sino la conservación de los compuestos energéticos del metabolismo.

La interpretación de los resultados señala la importancia del acil-fosfato en la regulación del metabolismo integral de *Gluconacetobacter entanii*.

El trabajo aporta las bases para el estudio del comportamiento cinético del metabolismo integral de esta especie, lo que permitirá desarrollar un modelo no estructurado de las células de *Gluconacetobacter entanii*.

Será interesante dilucidar la naturaleza química del polímero hidrofílico producido por *Gluconacetobacter entanii*, así como estudiar sus propiedades reológicas y de retención de agua.

El modelo desarrollado está limitado por el enfoque de homeostasis y no permite describir los fenómenos dinámicos del metabolismo estudiado. Es necesario realizar experimentos para establecer la cinética del consumo de ácido acético, etanol, glucosa, fructosa y oxígeno, describiéndola con expresiones cinéticas del tipo de Michaelis y Menten.

El estudio estequiométrico y el estudio cinético en conjunto sentarán las bases para desarrollar un modelo del crecimiento de la biopelícula de este microorganismo.

Finalmente, desde el punto de vista del desarrollo de la producción del polímero extracelular, resultaría interesante experimentar con la supresión de los genes que regulan la dotación del complejo glucán-sintasa.

VII.- Bibliografía

Altschul, S. F.; Myers, E. W.; Miller, W.; Gish, W. y Lipman, D. (1990); “Basic Local Alignment Search Tool” *J. Mol. Biol.* **215** (3): 403 – 410.

Atkinson, B, Mavituna, F. (1983) “Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook”. The Nature Press.

Bailey, J., Ollis, D. T. (1986) “Biochemical Engineering Fundamentals” Mc Graw-Hill.

Bazua, C. D. y Wilke, C. R. (1977); “Ethanol effects on the kinetics of a continuous fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*.” *Biotech. Bioeng, Symp.* **7**: 105 – 118.

Bellgardt, K.-H. (2000) “Bioprocess models” (En Schügerl, K. and Bellgardt, K.-H., eds. “Bioreaction Engineering. Modeling and Control”. Springer Verlag).

Benziman, M. y Palgi, A. (1970) “Characterization and properties of the Pyruvate Phosphorilation system of *Acetobacter xylinum*” *Journal of Bacteriology.* **104** (1): 211-218.

Blanch, H. W.; Clark, D. (1997) “Biochemical Engineering” Marcel Dekker.

Caggia, C. y Giudici, P. (1996) “Stato attuale delle conoscenze sulla tassonomia dei batteri acetici” *Industria della bevande.* **XXV** (Aprile).

Chao, Y., Ishida, T., Sugano, Y., Shoda, M. (2000) “Bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* in a 50-L internal-loop airlift reactor” *Biotechnol. Bioeng.* **68** (3): 345-352.

Chávez-Pacheco, J. L.; Martínez-Yee, S.; Contreras, M. L.; Gómez-Manzo, S.; Membrillo-Hernández, J., Escamilla, J. E. (2005) “Partial bioenergetic characterization of *Gluconoacetobacter xylinum* cells released from cellulose pellicles by a novel methodology” *Journal of Applied Microbiology.* **99**: 1130-1140.

Cortassa, S., y Aon, M. A., Iglesias, A. A., Lloyd, D. (2004) “An Introduction to Metabolic and Cellular Engineering”, World Scientific.

Cronenberg, C. C. H. (1994) “Biofilms investigated with needle-type glucose sensors” Ph D Thesis, University of Amsterdam, Netherlands.

Cullen, D. W. and Hirsch, P. R. (1988) “Simple and rapid method for direct extraction of microbial DNA from soil to PCR” *Soil Biol. Biochem.* **2** (3): 983 – 993.

Czaja, N.; Krystynowics, A.; Kaweki, M.; Wysota, K.; Sakiez, S.; Wroblewski, P.; Glik, J.; Nowak, M. y Bielicki, S. (2007) “Biomedical applications of Microbial Cellulose in Burn Wound Recovery” en “Cellulose Molecular and Structural Biology” (Brow, R. M. y Saxena, I. M.)

Deeraksa, A., Moonmangmee, S., Toyama, H., Yamada, M., Adachi, O., Matsushita, K. (2005) “Characterization and spontaneous mutation of a novel gene, *polE*, involved in pellicle formation in *Acetobacter tropicalis*, SKU1100” *Microbiology*, **151**: 4111-4120.

De Faveri D, Torre, P., Molinari F., Perego P., Converti A., (2003) “Carbon material balances and bioenergetics of 2,3-butanediol bio-oxidation by *Acetobacter hansenii*” *Enzyme and Microbial Technology* **33** 708–719.

Duboc, F.; Boesch, C.; Cavadini, C.; Fischer, M. (2002) “Extracellular Polysaccharide from *Gluconacetobacter* spp.”. European Patent 1203822.

Fernández-Sandoval. M. T. (2004) “Determinación de parámetros cinéticos que describan el metabolismo estructurado de *Acetobacter xylinum*” Tesis Profesional ENCB. IPN. México

Franke-Whittle, I. H., O’ Shea, M., Leonard, G. J., Lindsay, I. S. (2005) “Design, Development, and Use of Molecular Primers and Probes for the Detection of *Gluconacetobacter* Species in the Pink Sugarcane Mealybug” *50* (1): 128-139.

Fuentes-Ramírez, L. E., Bustillos-Cristales, R., Tapia-Hernández, A., Jiménez-Salgado, T., Tao Wang E., Martínez-Romero, E., Caballero_Mellado, J. (2001) “Novel nitrogen-fixing scetic acid bacteria, *Gluconacetobacter johannae* sp. nov and *Gluconacetobacter azotocaptans* sp. nov., associated with coffee plants” *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**: 1305-1314.

Gallazo, B., y Bailey, J, (1990), “Fermentation Pathway Kinetics and Metabolic Flux Control in suspended and immobilized *S. cerevisiae*”, *Enzyme Microb. Technol.* **12**: 163.

Gikas, P. (1996) “Influence of Biomass activity on the performance of immobilized cell bioreactors” Ph D Thesis. University of London.

Gikas, P. and Livingstone, A., (1998) ”Use of specific ATP concentration and specific oxygen uptake rate to determine parameters of a structured model for biomass growth” *Enzyme and Microbial Technology*, **22**: 500 – 510.

González-Higuera, H. C. (2004) “Determinación de parámetros cinéticos del metabolismo estructurado de *Acetobacter xylinum*. El consumo de etanol”. Tesis Profesional ENCB .IPN. México.

Gottschalk, G. (1986) “Bacterial Metabolism” Springer Verlag. pp. 169 – 171, 434 – 435.

Han, N. S.; Robyt, J. F. (1998) “The mechanism of *Acetobacter xylinum* cellulose biosynthesis” *Carbohydrate Research*; **313**: 125 – 133.

Herbert, D. (1964) en “Continuous culture of microorganisms” Ed I. Malek p 23 Czechoslovak Academy of Sciences.

Ishida, T., Mitarai, M., Sugano, Y., Shoda, M. (2003) “Role of water – soluble polysaccharides in Bacterial Cellulose production” *Biotechnology and Bioengineering* **83** (4): 474 – 478.

- Jansson, P.-E., Lindbergh, J., Wimalasiri, K. M. S, Dankert, M. A. (1993) “Structural studies of acetan, an exopolysaccharide elaborated by *Acetobacter xylinum*” Carbohydrate Research **245** (2): 303 – 310.
- Jorgensen A. and Hansen, A. (1948) “Microorganisms and fermentation” p. 396. Ch. Griffin and Co. London.
- Keshk, S. M. A. S.; Sameshima, K. (2005) “Evaluation of different carbon sources for bacterial cellulose production” African Journal of Biotechnology **4** (6): 478-482.
- Kovarova-Kovar, K.; Egli, T. (1998) “Growth kinetics of suspended microbial cells: from single-substrate-controlled growth to mixed-substrate kinetics” Microbiol. Molec. Biol Rev. **62** (3): 1092-2172.
- Kornmann, H., Duboc, P., Marison, I. y von Stockar, U. (2003a) “Influence of nutritional factors on the nature, yield and composition of Exopolysaccharides produced by *Gluconacetobacter xylinus* I-2281” Applied and Environmental Microbiology. **60** (10): 6091 – 6098.
- Kornmann, H.; Duboc, P.; Niederberger, P., Marison, I.; von Stockar, U. (2003b) “Influence of residual ethanol concentration on the growth of *Gluconacetobacter xylinus* I 2281” Applied Microbiology and Biotechnology. **62** (2-3): 168-173.
- Krystynowicz, A., Koziolkiewicz, M., Wiktoriozka-Jezierka, A., Bielicki, S., Plucienniczak, A. (2005) “Molecular basis of cellulose biosynthesis disappearance in submerged culture of *Acetobacter xylinum*” Acta Biochimica Polonica **52** (3) 691-698.
- Krystynowics, A.; Czaja, W.; Wiktorioska-Jesierzka, A.; Gonzalves-Miskiewics, M.; Turkiewics, M. y Bielicki, S. (2002) “Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose” Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. **29**: 189-195
- Lisdiyanti. P., Kawasaki, H., Widyastuti, Y., Susono, T., Seki, Y. Yamada, T., Uchimura, T. and Komagata, K. (2002) “*Kozakia baliensis* gen. nov., sp. nov. a novel acetic acid bacterium in the a-Proteobacteria” Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **52**: 813-818.
- Lubbert, A. (2001) “Bubble Column Bioreactors” en “Bioreaction Engineering” ED Schügerl, K. y Bellgardt, H. K. Springer Verlag
- Macías, M., Caro, I.; Cantero, D. (1996) “Optimum operating conditions in closed-system industrial acetifiers (batch operation): a study by computer simulation” Chem. Eng. J. **62**: 183-191.
- Mauch, K.; Vasaghi, S.; Reuss, M. (2000) “Quantitative Analysis of Metabolic and Signaling Pathways in *Saccharomyces cerevisiae*”, (en “Bioreaction Engineering”, compiladores Schügerl, K. y Bellgardt, K., Springer Verlag).
- Matsushita, K.; Takakai, Y.; Shinagawa, E.; Ameyama, M. y Adachi, O. (1992) “Ethanol oxidase respiratory chain of Acetic Acid Bacteria” Biosci. Biotech. Biochem. **56**: 304 – 310.
- Monod, J. (1949) “The growth of bacterial cultures” Ann. Rev. Microbiol. **3**:371-394.

- Moonmangmee, S., Toyama, H., Adachi O., Theragool, G., Lotong, N., Matsushita, K. (2002) "Purification and characterization of a novel polysaccharide involved in the pellicle produced by a thermotolerant *Acetobacter* strain" *Biosci, Biotechnol, Biochem.* **66** (4) 777-783.
- Moxley, J. F., Stephanopoulos, G., y Rigoutsos, I. (2004) "Systems biology: Using systems approaches to manage biological complexity" VI International Conference of Computer Aided Process Design. Princeton, New Jersey.
- Nakagaito, A. N.; Iwamoto, S.; Yano, H. (2005) "Bacterial cellulose: the ultimate nano-scalar cellulose morphology for the production of high strength composites". *Appl. Phys. Materials Science and Processing.* **80** (1): 93-97.
- Naritomi, T.; Kouda, T; Yano, H.; Yoshinaga, F. (1998) "Effect of Ethanol on Bacterial Cellulose Production from Fructose in Continuous Culture" *J. Ferment. and Bioeng.* **85** (6): 598 -603.
- Nielsen, J. (1994) "Physiological engineering aspects of *Penicillium chrysogenum*". DTU.
- Nielsen, J., Villadsen, J., Lidén, G. (2003) "Bioreaction engineering principles" 2nd edition. Kluwer/Plenum Press.
- Nielsen, J. Y Villadsen, J. (1992). "Modeling of Microbial Kinetics" *Chem. Eng Sci.* **47**: 4225 – 4270.
- Odegaard, N; Carroll, S.; Zimmt, W.S. (2000) "Material characterization tests for objects of art and archaeology". Archetype Publications.
- Parés, R. y Juárez, A. (1997) "Bioquímica de los Microorganismos". Reverté, Barcelona.
- Pirt, S. J. (1975) "Principles of Microbe and Cell Cultivation" Blackwell Scientific Publications. London
- Razo Contreras, E. (2001) "Parámetros cinéticos del crecimiento de *Acetobacter xylinum* en biopelícula". Tesis Profesional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. IPN.
- Reuss, M., Schmaltzriedt, S., Jenne, M. (2001) "Application of Computational Fluid Dynamics (CFD) to Modelling Stirred Tank Bioreactors" en "Bioreaction Engineering". Springer Verlag.
- Rodríguez-Carranza, N. (2004) "Determinación de parámetros cinéticos que describan el metabolismo estructurado de *Acetobacter xylinum*. El consumo de oxígeno" Tesis Profesional. ENCB. IPN. México.
- Roels, J. A. (1983) "Energetics and kinetics in biotechnology" Elsevier.
- Rosello-Mora, R.; García-Valdés, E.; Lalucat, J.; Ursing, J. (2001) "The species concept in prokariotes". *FEMS Microbiological Reviews* **25**: 39 – 67.
- Schaeffer, E. J., Futran, M. (2004) "Challenges of Computer Aided Design of Bioprocesses" VI Conference of Computer Aided Process Design". Princeton, New Jersey.

- Schulze, U. "Anaerobic metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*" Tesis Doctoral, DTU; 1998
- Schüller, G., Hertel, C. Hammes, W. P. (2000) "*Gluconacetobacter entanii* sp. nov., isolated from submerged high-acid industrial vinegar fermentations" *Int. J. Syst. and Evol. Microbiol.* **50**: 2013-2020.
- Shigematsu, T., Takamine, K., Morita, T., Naritomi, T., Morimura, S., Kida, K. (2005) "Cellulose production from glucose using a glucose dehydrogenase gene (*gdh*)-deficient mutant of *Gluconacetobacter xylinus* and its use for bioconversion of sweet potato pulp" *J. of Biosc. and Bioeng.* **99** (4): 415-422.
- Sokollek, S., Hertel, C., Hammes, W. P. (1998) "Cultivation and preservation of vinegar bacteria" *J. Biotechnol.* **60** (3): 195-206.
- Son, H.-J., Heo, M.-S., Kim, Y.-G., Lee, S.-G. (2001) "Optimization of fermentation conditions for the production of bacterial cellulose by a newly isolated *Acetobacter* sp A9 in shaken culture". *Biotechnology and Applied Biochemistry.* **33**: 1-5.
- Sweere, A. P. J.; Luyben, K. Ch. A. M.; Kossen, N. W. F. (1987) "Regime analysis and scale down: tools to investigate the performance of bioreactors" *Enzyme Microb. Technol.* **9**:386-398.
- Swings, J. (1992) "The genera *Acetobacter* and *Gluconobacter*" in "The Prokariotes: a Handbook on the Biology of Bacteria". **3**: 2268-2286 Ed. by Balows, A., Trüper H. G., Dworkin, M. Harder, W. and Schleifer, K.-H- Springer, New York.
- Thatipamala, R.; Rohani, S y Hill, G. A. (1992); "Effects of High Product and Substrate Inhibitions on the Kinetics and Biomasa and Product Yields during Ethanol Batch Fermentation"; *Biotech. and Bioeng.* **40**: 289 – 297.
- Toda, K., Asajura, T., Fuyaka, M., Entani, E. and Kawamura, Y. (1997) "Cellulose Production by Acetic acid-resistant *Acetobacter xylinum*" *Journal of Fermentation and Bioengineering.* **84** (3): 228-231.
- Tonouchi, N., Tsuchida, T., Yoshinaga, F., Beppu, T. y Horinouchi, S. (1996) "Characterization of the Biosynthetic pathway of Cellulose from Glucose and Fructose in *Acetobacter xylinum*" *Biosci. Biotec. Biochem.* **60** (8): 1377 – 1379.
- Torres, N. y Voit, E. (2002) "Pathway Analysis and Optimization in Metabolic Engineering" Cambridge University Press.
- Toyama, K.; Minakami, H.; Entani, E.; Fujiyama. S. y Masai, H.; (1985) "Isolation and Characterization of a New Polysaccharide-producing *Acetobacter* sp." *Agric. Biol. Chem.* **49**: 959 - 996.
- Trceck, J., Teuber, M. (2002) "Genetic and restriction analysis of the 16S–23S rDNA internal transcribed spacer regions of the acetic acid bacteria" *FEMS Microbiology Letters* **208** (1): 69.

Urakami, T., Yashima, K., Kobayashi, H., Yoshida, A., Ito-Yoshida, C. (1992) "Production of Pyrroloquinoline Quinone by using Methanol-Utilizing Bacteria" *Appl. Env. Microbiol.***22**: 3970.

Urakami, T., Tamaoka, J., Suzuki, K., Komagata, K. (1989) "*Acidomonas* gen. nov. incorporating *Acetobacter methanolicus* as *Acidomonas Methanolica* comb. nov." *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**: 50-55.

Velasco-Bedrán, H.; Esparza-Isunza, T.; López-Isunza, H. F. (2001) "A dynamic model for an extractive membrane bioreactor for VOC removal" VIII Chemical Reaction Engineering Conference, Barga, Italia.

Verduyn K., (1992), "Effect of Benzoic Acid on Metabolic Fluxes in Yeasts: A Continuous Culture Study on the Regulation of Respiration and Alcoholic Fermentation", *Yeast* **8**: 501.

Yamada, Y. (2000) "Transfer of *Acetobacter oboediens* Sokollek et al. 1998 and *Acetobacter intermedius* Boesch et al. 1998 to the genus *Gluconacetobacter* as *Gluconacetobacter oboediens* comb. nov. and *Gluconacetobacter intermedius* com. nov." *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**: 2225 – 2227.

Yong Jung, J., Kon Park J., Nam Chang, H. (2005) "Bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter hansenii* in an agitated culture without living non-cellulose producing cells" *Enz Microb Techn.* **37**: 347-354.

Wolfe, A. J. "The Acetate Switch" *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* (2005) **69** (1): 12-50.

VIII.- Apéndices

VIII.1.- La secuencia de las bases nucleotídicas del gen 16S rRNA del microorganismo estudiado.

La secuencia de bases nucleotídicas para la cepa objeto de este estudio es la siguiente:

>gi|11344595|gb|AF192761.1|AF19

-----CCCGT

AGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCACGTGCCGCGGTAATACGAAGGGGG
CTAGCGTT
GCTCGGAATGACTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGGTTTGGACAGTCAGAT
GTGAAATTC
CTGGGCTTAACCTGGGGGCTGCATTTGATACGTACAGACTAGAGTGTGAGAG
AGGGTTGT
GGAATTCCCAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTTGGGAAGAACACCGGTG
GCCAAGGC
GGCAACCTGGCTCATAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACA
GGATTAGA
TACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTGTGCTGGATGTTGGGTGGCTTAG
CCACTCA
GTGTCGTAGTTAACGCGATAAGCACACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGT
TGAAACTC

AAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGA
AGCAACGC
GCAGAACCTTACCAGGGCTTGACATGGGGAGGCTGTGTTTCAGAGATGAGCAT
TTCCCGCA
AGGGACCTCCTGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGAT
GTTGGGT
TAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCTTTAGTTGCCAGCATGTTTGGGTG
GGCACTC
TAAAGGAACTGCCGGTGACAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTC
CTCATGGCC
CTTATGTCCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAGTGGGAAGCCA
GGCAGCGA
TGCCGAGCTGATCTCAAAAAGCCGTCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCAACTCG
GGTGCAT
GAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCC
CGGGCCT
TGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTTGGTTTGA

>ACE-NVZ2

TTANTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTAGGGATCTGTCCATGGGTGGGGGATAACC
T
TGGGAAACCGAGGCTAATACCGCATGACACCTGAGGGTCAAAGGCGCAAGTC
GCCTGTGG
AGGAACCTGCCTTCGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGA
TGATCGAT

AGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGNCCAGAC
TCCTACGG
GAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCAATG
CCGCGTGT
GTGAAGAAGGTTTTCGGATTGTAAGCACITTCAGCGGGGACGATGATGACG
GTACCCGC
AGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGG
CAAGCGTT
GCTCGGAATGACTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGGTTGTTACAGTCAGATG
TGAAATTC
CCGGGCTTAACCTGGGGGCTGCATTTGATACGTGACGACTAGAGTGTGAGAG
AGGGTTGT
GGAATTCCCAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGAAGAACACCGGTG
GCCAAGGC
GGCAACCTGGCTCATGACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACA
GGATTAGA
TACCCTGGTAGTCCACGCTGTAACGATGTGTGCTGGATGTTGGGTGGCTTG
GCCATTCA
GTGTTCGTAGTTAACGCGATAAGCACACCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGT
TGAAACTC
AAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGA
AGCAACGC
GCAGAACCTTACCAGGGCTTGACATGCGGAGGCTGTGTCCAGAGATGGGCAT
TTCTCGCA
AGAGACCTCCAGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTTCGTGAGAT
GTTGGGT
TAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCTTTAGTTGCCAGCACGTCTGGGTG
GGCACTC
TAAAGGAACTGCCGGTGACAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTC
CTCATGGCC
CTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAGTGGGAAGCCA
GGCAGCGA

TGCCGAGCGGATCTCCAAAAGCCGTCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCAACTCG
AGTGCAT

GAAGGTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTC
CCGGGCCT

TGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGTTTGA

>gi|6468292|emb|AJ251110.1|

-----TACCCGC

AGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGG
CAAGCGTT

GCTCGGAATGACTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGGTTGTTACAGTCAGATG
TGAAATTC

CCGGGCTTAACCTGGGGGCTGCATTTGATACGTGGCGACTAGAGTGTGAGAG
AGGGTTGT

GGAATTCCCAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGAAGAACACCGGTG
GCGAAGGC

GGCAACCTGGCTCATGACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACA
GGATTAGA

TACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTGTGCTGGATGTTGGGTGGCTTG
GCCATTCA

GTGTCGTAGTTAACGCGATAAGCACACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGT
TGAAACTC

AAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGA
AGCAACGC
GCAGAACCTTACCAGGGCTTGACATGCGGAGGCTGTGTCCAGAGATGGGCAT
TTCTCGCA
AGAGACCTCCAGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGAT
GTTGGGT
TAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCTTTAGTTGCCAGCACGTCTGGGTG
GGCACTC
TAAAGGAACTGCCGGTGACAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTC
CTCATGGCC
CTTATGTCCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAGTGGGAAGCCA
GGCAGCGA
TGCCGAGCGGATCTCCAAAAGCCGTCTCAGTTTCGGATTGCACTCTGCAACTCG
AGTGCAT
GAAGGTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTC
CCGGGCCT
TGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTTGGTTTGA

>gi|60418032|dbj|AB205220.1|

-----CACTTTCAGCGGGGACGATGATGACGGTACCCGC
AGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGG
CAAGCGTT

GCTCGGAATGACTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGGTTGACACAGTCAGATG
TGAAATTC
CTGGGCTTAACCTGGGGGCTGCATTTGATACGTGGCGACTAGAGTGTGAGAG
AGGGTTGT
GGAATTCCCAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGAAGAACACCGGTG
GCCAAGGC
GGCAACCTGGCTCATGACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACA
GGATTAGA
TACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTGTGCTGGATGTTGGGTGACTTTG
TCATTCA
GTGTCGTAGTTAACGCGATAAGCACACCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGT
TGAAACTC
AAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGA
AGCAACGC
GCAGAACCTTACCAGGGCTTGACATGCGGAGGCCGTGTCCAGAGATGGGCAT
TTCTCGCA
AGAGACCTCCAGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTTCGTGAGAT
GTTGGGT
TAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCTTTAGTTGCCATCACGTCTGGGTG
GGCACTC
TAAAGGAACTGCCGGTGACAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTC
CTCATGGCC
CTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAGTGGGAAGCCA
GGTAGCGA
TACCGAGCCGATCTCAAAAAGCCGTCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCAACTCGA
GTGCAT
GAAGGTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTC
CCGGGCCT
TGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTTGGTTTGA

>gi|60418031|dbj|AB205219.1|

-----ACTTTCAGCGGGGACGATGATGACGGTACCCGC
AGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGAAGGGGG
CAAGCGTT
GCTCGGAATGACTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGGTTGACACAGTCAGATG
TGAAATTC
CTGGGCTTAACCTGGGGGCTGCATTTGATACGTGGCGACTAGAGTGTGAGAG
AGGGTTGT
GGAATTCCCAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGAAGAACACCGGTG
GCGAAGGC
GGCAACCTGGCTCATGACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACA
GGATTAGA
TACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTGTGCTGGATGTTGGGTGACTTTG
TCATTCA
GTGTCGTAGTTAACGCGATAAGCACACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGT
TGAAACTC
AAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGA
AGCAACGC
GCAGAACCTTACCAGGGCTTGACATGCGGAGGCCGTGTCCAGAGATGGGCAT
TTCTCGCA
AGAGACCTCCAGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGAT
GTTGGGT
TAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCTTTAGTTGCCAGCACGTCTGGGTG
GGCACTC

TAAAGGAACTGCCGGTGACAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTC
CTCATGGCC

CTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAGTGGGAAGCCA
GGTAGTGA

TACCGAGCCGATCTCAAAAAGCCGTCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCAACTCGA
GTGCAT

GAAGGTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTC
CCGGGCCT

TGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGTTTGA

>gi|51968305|dbj|AB166744.1|

-----AAAGCACTTTCAGCGGGGACGATGATGACGGTACCCGC
AGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGG
CAAGCGTT

GCTCGGAATGACTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGGTTGTTACAGTCAGATG
TGAAATTC

CCGGGCTTAACCTGGGGGCTGCATTTGATACGTGACGACTAGAGTGTGAGAG
AGGGTTGT

GGAATTCCCAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGAAGAACACCGGTG
GCCAAGGC

GGCAACCTGGCTCATGACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACA
GGATTAGA

TACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTGTGCTGGATGTTGGGTGGCTTG
GCCATTCA

GTGTTCGTAGTTAACGCGATAAGCACACCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGT
TGAAACTC

AAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGA
AGCAACGC

GCAGAACCTTACCAGGGCTTGACATGCGGAGGCCGTGTCCAGAGATGGGCAT
TTCTCGCA

AGAGACCTCCAGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTTCGTGAGAT
GTTGGGT

TAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCTTTAGTTGCCAGCACGTCTGGGTG
GGCACTC

TAAAGGAACTGCCGGTGACAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTC
CTCATGGCC

CTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAGTGGGAAGCCA
GGCAGCGA

TGCCGAGCGGATCTCCAAAAGCCGTCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCAACTCG
AGTGCAT

GAAGGTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTC
CCGGGCCT

TGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGTTTGA

>gi|51968302|dbj|AB166741.1|

-

CTGGCTCAGAGCGAACGCTGGCGGCATGCTTAACACATGCAAGTCGCACGAACCTTT
CG

GGGTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTAGGGATCTGTCCATGGGTGGG
GGATAACTT

TGGGAAACTGAAGCTAATACCGCATGACACCTGAGGGTCAAAGGCGCAAGTC
GCCTGTGG
AGGAACCTGCGTTCGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGA
TGATCGAT
AGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGAC
TCCTACGG
GAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCAATG
CCGCGTGT
GTGAAGAAGGTTTTTCGGATTGTAAAGCACITTCAGCGGGGACGATGATGACG
GTACCCGC
AGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGG
CAAGCGTT
GCTCGGAATGACTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGGTTTTAACAGTCAGATG
TGAAATTC
CTGGGCTTAACCTGGGGGCTGCATTTGATACGTTGAGACTAGAGTGTGAGAG
AGGGTTGT
GGAATTCCCAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGAAGAACACCGGTG
GCGAAGGC
GGCAACCTGGCTCATTACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACA
GGATTAGA
TACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTGTGCTGGATGTTGGGTGACTTTG
TCATTCA
GTGTCGTAGTTAACGCGATAAGCACACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGT
TGAAACTC
AAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGA
AGCAACGC
GCAGAACCTTACCAGGGCTTGACATGCGGAGGCCGTGTCCAGAGATGGGCAT
TTCTCGCA
AGAGACCTCCAGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGAT
GTTGGGT
TAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCTTTAGTTGCCATCACGTTTGGGTG
GGCACTC

TAGAGGAACTGCCGGTGACAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTC
CTCATGGCC

CTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAGTGGGAAGCCA
GGTAGCGA

TACCGAGCCGATCTCTAAAAGCCGTCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCAACTCGA
GTGCAT

GAAGGTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTC
CCGGGCCT

TGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGTTTGA

VIII. 2. Sobre la cinética de consumo de nutrientes.

La relación entre la concentración intracelular de un metabolito y la tasa de asimilación de un sustrato por una enzima asociada a ese metabolito intracelular, es un mecanismo complejo. En seguida, unas notas sobre esa interrelación, tomado como ejemplo el consumo de etanol mediante su oxidación por la alcohol-deshidrogenasa.

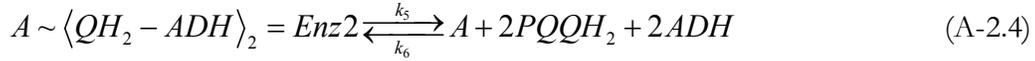
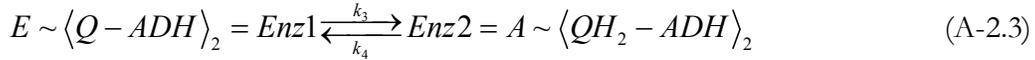
Bioquímica.

El mecanismo conocido para el consumo del etanol involucra su oxidación en la membrana celular por la alcohol deshidrogenasa a acetaldehído y luego la oxidación de éste por la acetaldehído deshidrogenasa a ácido acético. Ambas enzimas son quinoproteínas que utilizan la pirrolo quinolinquinona como grupo prostético. Haciendo una sola reacción de ambas, la reacción sería:



Hipótesis del mecanismo de reacción.

Suponiendo el siguiente mecanismo para la reacción agrupada:



Expresión cinética.

Haciendo la conservación de masa de las especies pertinentes, y considerando a la reacción de la ecuación A-2.2, como la más lenta, llegamos a

$$\mu_E = \frac{\mu_{E_{max}} \varepsilon_Q C_E}{K_E + \varepsilon_Q} \quad (A-2.6)$$

En A-2.6 $\mu_{E_{max}}$ la máxima velocidad de consumo de etanol resulta de agrupar a k_1 (la constante de la reacción en sentido positivo de la incorporación del etanol (ecuación A-2.2) multiplicando a ADH , la dotación total intracelular de la “alcohol deshidrogenasa” (en nuestro agrupamiento, la suma de la alcohol deshidrogenasa y la aldehído deshidrogenasa totales).

En nuestra expresión A-2.6, la concentración extracelular de etanol es la variable independiente. Pero, ¿cuál es la relación entre ε_Q y μ_E ?

μ_E es función de ε_{ADH1} la cual a su vez es función de la dotación del gen que codifica la síntesis de alcohol- y aldehído-deshidrogenasas y de su nivel de expresión, las cuales dependen del nivel de algún metabolito cíclico. Pero a su vez, ε_Q no es constante ni es independiente. Savinell y Palsson (1992a, en Cortassa, 2002) proponen de manera general la siguiente formalización para estimar el nivel de un metabolito:

$$\frac{d\varepsilon_j}{dt} = \Gamma\mu - \beta \quad A-2.7$$

En la ecuación anterior Γ es la matriz j^*m de los coeficientes estequiométricos de los j metabolitos considerados en m flujos metabólicos, μ es el vector de los m flujos metabólicos y β es el vector de los flujos biosintéticos conocidos.

En el caso general del metabolismo, esto es, *no considerando el estado estacionario de los metabolitos intracelulares*:

$$\frac{d\varepsilon_Q}{dt} = \mu_{Qform} + 2\phi\mu_O - \mu_E \quad A-2.8$$

En A-2.8 μ_{Qform} es la tasa metabólica de síntesis *de novo* de la PQQ, ϕ es la proporción del oxígeno reducida por la PQQ y μ_O es la tasa específica de consumo de oxígeno. Se considera el cambio del nivel intracelular de PQQ como la variable dependiente y la tasa específica de consumo de etanol, como la variable independiente.

Esto debe ser analizado considerando los tiempos de relajación de las velocidades metabólicas involucradas. En A-2.7, por ejemplo, el impacto de las velocidades β , cuyo tiempo característico es de horas, no tienen un impacto tan grande si se están analizando las velocidades catabólicas, cuyo tiempo significativo es de minutos. En un análisis de este orden, *el nivel metabólico intracelular, no es la variable independiente*.

Sobre esta base pretendemos desarrollar el modelo objeto de esta tesis en sus aspectos **cinéticos**.

(E, C₂H₆O, Etanol; Q, Pirrolo quinolinquinona, (PQQ); ADH1, Alcohol Deshidrogenasa; S₁, la quinoproteína Alcohol Deshidrogenasa; E-S₁, el complejo Etanol - quinoproteína; ADH2, Acetaldehído deshidrogenasa; A₀, Acetaldehído; S₂, la quinoproteína Acetaldehído deshidrogenasa; A₀ - S₂, el complejo Acetaldehído quinoproteína; A, Ácido acético (C₂H₄O₂), X= Biomasa;

C_i, Concentración de “i”; i = E, A, X;

ε_j , concentración intracelular de “j”, j = Q, ADH.).

VIII. 3. La caracterización del biorreactor empleado.

El modelo del biorreactor.

El biorreactor se modeló como se ha mostrado en la Figura 2 del texto principal. Se consideran tres fases: la fase líquida en la cual se encuentran disueltos sustratos clave para el bio-proceso (sacarosa, glucosa y fructosa, etanol, ácido acético y las sales minerales), y en la cual también se encuentran en suspensión las burbujas de aire asperjado mediante los difusores de vidrio poroso y las partículas de la biopelícula (compuestas por los polímeros extracelulares y las células dispersas en éstos y que los producen).

La conservación de masa en la fase líquida para cualquier componente i se describe mediante una ecuación de la forma siguiente:

acumulacion de i = entrada de i + transporte interfásial – salida de i .

En términos matemáticos:

$$V_{op} \frac{dC_i}{dt} = QC_{ia} + V_{op} k_L a_{VG} (C_i^* - C_i) + V_{op} k_L a_{Vbp} (C_{ibp}^* - C_i) - QC_i \quad (A3-1).$$

En la ecuación A3-1 se consideran dos fenómenos de transporte interfásial; el segundo término del segundo miembro de la ecuación expresa el transporte gas-líquido (transferencia del oxígeno del gas al líquido o del etanol y el acético del líquido al aire) en tanto que el tercer miembro expresa el transporte líquido-biopelícula para los sustratos (oxígeno, etanol, sacarosa, glucosa, fructosa y ácido acético). Dividiendo entre el volumen de operación, la ecuación será:

$$\frac{dC_i}{dt} = D(C_{ia} - C_i) + k_L a_{VG} (C_i^* - C_i) + k_L a_{Vbp} (C_{ibp}^* - C_i) \quad (A3-2)$$

El transporte dentro de la biopelícula se describe según la difusión fickeana de la siguiente forma:

$$\varepsilon_{bp} \frac{\partial C_i}{\partial t} = \varepsilon_{bp} D_{effi} \frac{\partial^2 C_i}{\partial z^2} - \varepsilon_{bp} r_i \quad (A3-3).$$

Esta ecuación es válida para un grosor de biopelícula, z , entre 0 y l_{bp} . En esta frontera, se requiere la continuidad de flujo entre fases por lo que:

$$-k_L a_{Vbp} (C_{ibp} - C_i) = \varepsilon_{bp} D_{effi} \frac{\partial C_i}{\partial z} \quad (A3-4)$$

En los experimentos realizados, el tiempo de relajación para el fenómeno difusivo (tiempo

característico) considerando a la glucosa (cuya Difusividad es la menor de los metabolitos considerados) es de 0.16 h, en tanto que el tiempo característico de la reacción de crecimiento celular es de ~ 12.5 h, esto es, dos órdenes de magnitud mayor, por lo que es el fenómeno que gobierna el proceso

En esta circunstancia el biorreactor se puede modelar como un reactor pseudo homogéneo, considerando al microorganismo como células libres y al conjunto de la biomasa como una fase continua en el líquido.

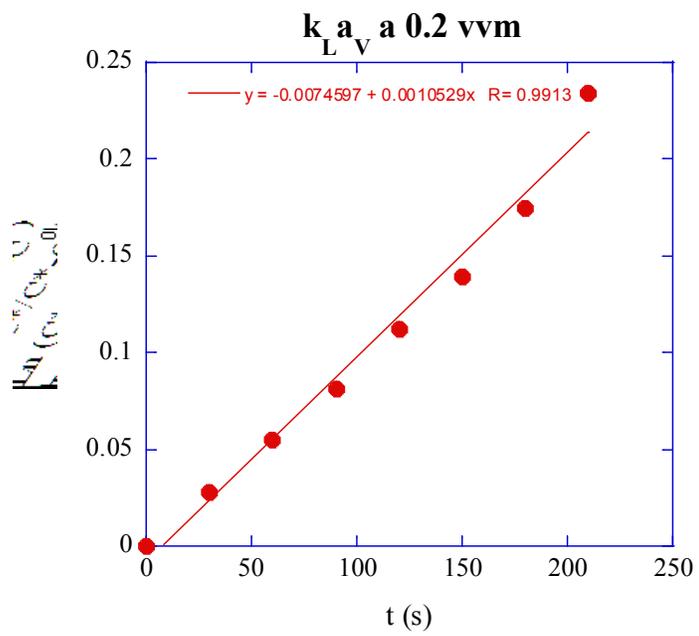
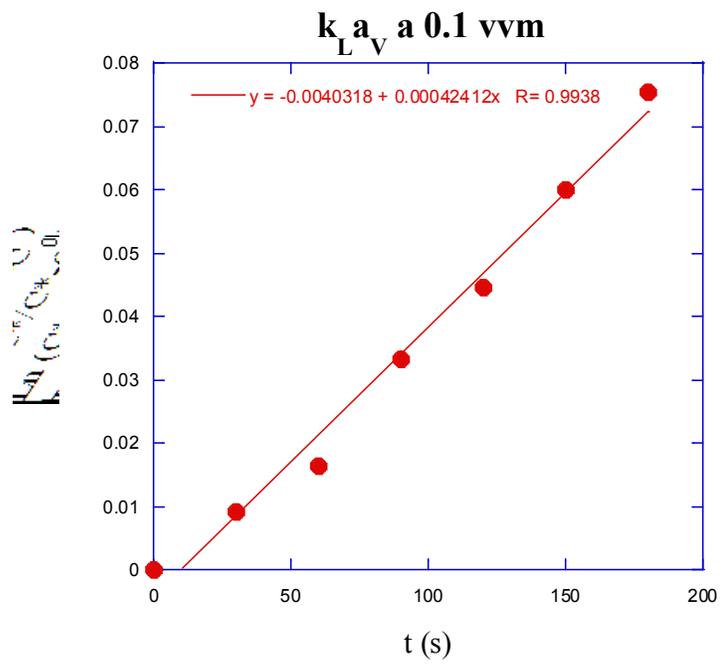
De lo anterior, la conservación de masa para el componente i se escribe:

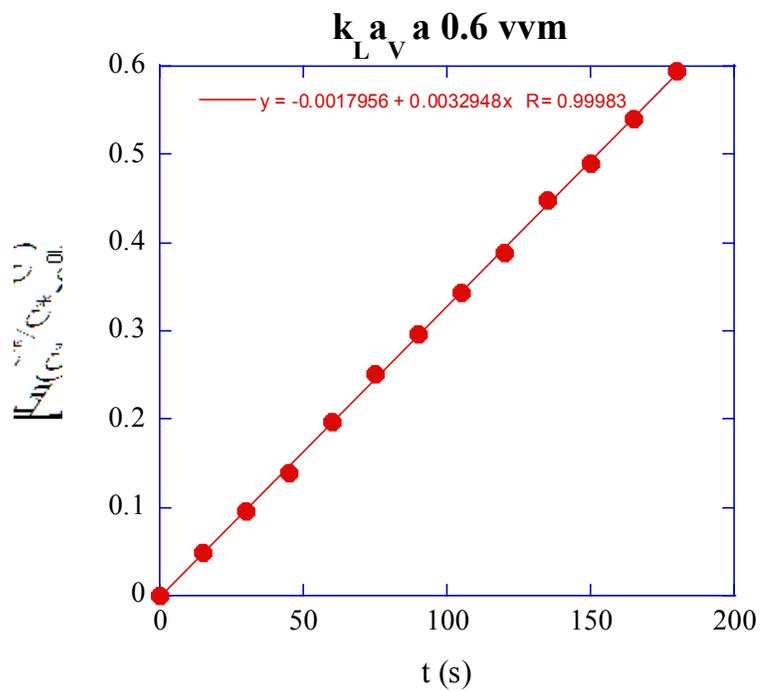
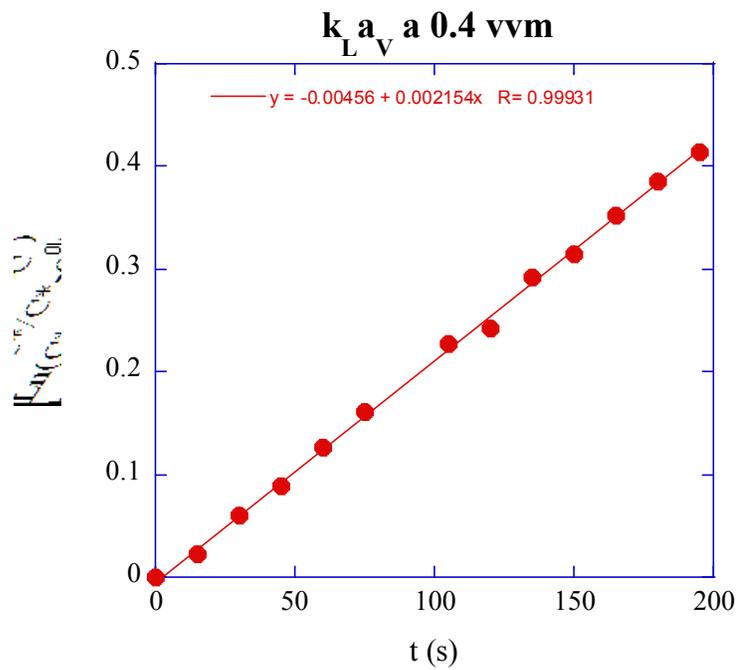
$$\frac{dC_i}{dt} = D(C_{ia} - C_i) + k_L a_{VG} (C_i^* - C_i) + r_i \quad (\text{A3-5})$$

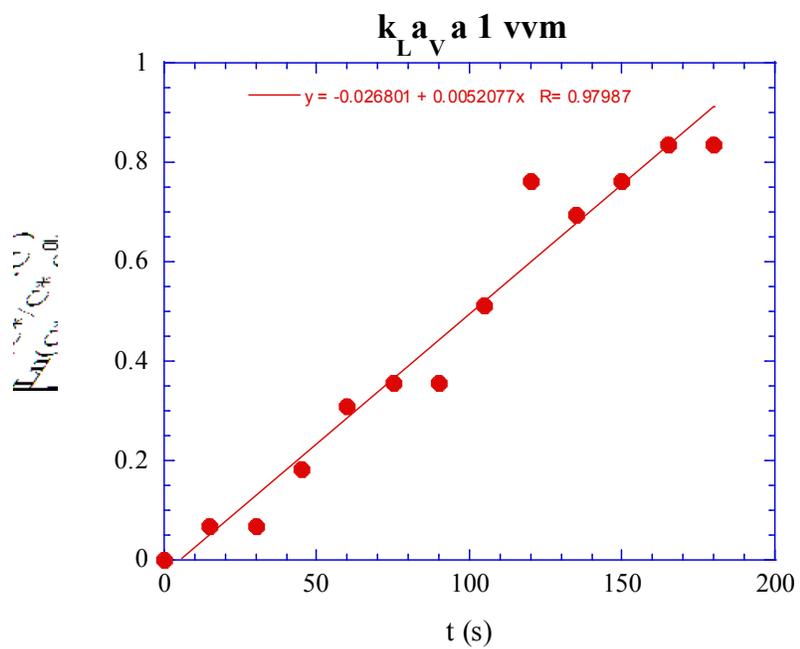
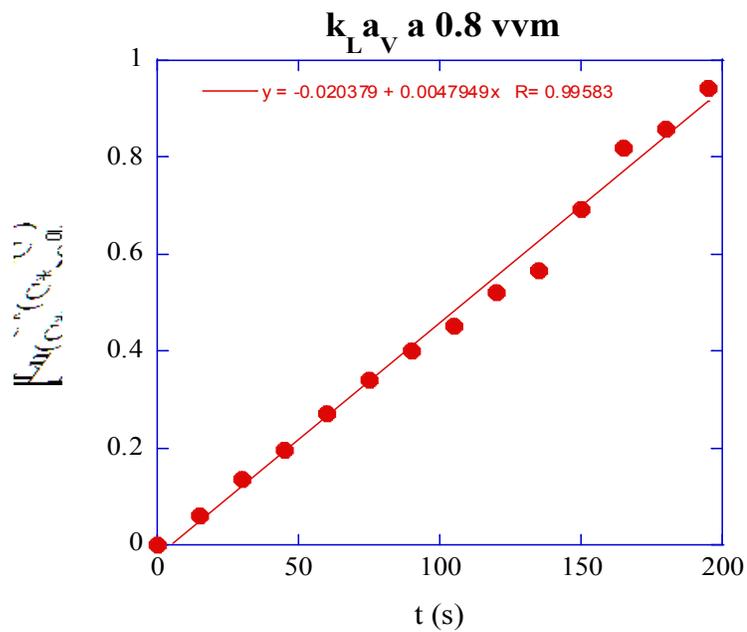
a_p , área interfacial específica; C_i , concentración del componente i ; $Deff_{ip}$, coeficiente de difusión efectiva del componente i ; K_s , coeficiente volumétrico de transferencia de masa en la interfase; Q , flujo volumétrico del líquido con nutrientes; V , volumen del reactor; z , distancia axial de la bio – película; l_{pp} , grosor medio de la partícula de biopelícula y r_i la tasa volumétrica de reacción.

La medición del Coeficiente Global de Transferencia de Masa.

$k_L a_{VG}$ fue medida a diversas velocidades de aireación de acuerdo con el procedimiento descrito en Materiales y Métodos, como se muestra a continuación y de acuerdo con la ecuación 4.







Los valores de la pendiente ($k_{L,V}$) de la recta de ajuste están en s^{-1} . Los valores (calculados en h^{-1}) se tabulan en seguida:

vvm (min^{-1})	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1
$k_L a_V$ (h^{-1})	1.53	3.79	7.75	11.86	17.26	18.75

Tabla A3-1. Los valores de $k_L a_V$ calculados de las pendientes de la linealización de los datos experimentales de concentración de oxígeno a diversas tasas de aireación.

De igual manera se calcularon los valores de $k_L a_V$ para la desorción de etanol y ácido acético, a la tasa de aireación seleccionada, midiendo la concentración de etanol y de ácido acético remanente en solución a diversos tiempos. Los valores calculados fueron de 0.05 y 0.02 h^{-1} para el etanol y para el ácido acético, respectivamente.

VIII.4.- “The unified biochemistry of *Gluconacetobacter entanii* in batch and continuous processes”.