



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

MAESTRÍA EN CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

TESIS

BIOPROSPECCIÓN DE NOVEDOSOS
EXOPOLISACÁRIDOS Y PLÁSTICOS HALOARQUEALES
ACUMULADOS POR *Haloferax mucosum*: PRODUCCIÓN,
CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y MACROMOLECULAR

Para obtener el grado de
Maestra en Ciencia de los Alimentos

PRESENTA

Ing. Marianela Escalante Avilés

Directora

Dra. Adriana Inés Rodríguez Hernández

Codirectora

Dra. Mayra Alejandra López Ortega

Comité tutorial

Dr. Norberto Chavarría Hernández

Dra. Ma. Del Rocío López Cuellar

Tulancingo de Bravo, Hgo., México, octubre, 12-2023



COORDINACION DE INVESTIGACION Y POSGRADO DEL ICAp

**Actas de la reunión del Comité de Tesis de Maestría en Ciencia de los Alimentos
 Apertura:**

La reunión ordinaria para evaluar los avances de la tesis intitulada: **“Bioprospección de novedosos exopolisacáridos y plásticos haloarqueales acumulados por *Haloferax mucosum*: producción, caracterización química y macromolecular”**, que desarrolla la estudiante **Marianela Escalante Avilés**

Asistentes:

- Dra. Adriana Inés Rodríguez Hernández
- Dra. Mayra Alejandra López Ortega
- Dr. Norberto Chavarría Hernández
- Dra. Ma del Rocío López Cuellar

A. Revisión de Trabajo de Tesis

Observaciones:

El comité revisó con antelación el trabajo de tesis en extenso propuesto por la estudiante, comunicando a la estudiante, Marianela Escalante Avilés, oportunamente las correcciones, adiciones y/o modificaciones que debería considerar para mejorar su trabajo y poder continuar con el proceso de obtención de grado. La estudiante atendió de forma conveniente las sugerencias del comité.

B. Acuerdos

En esta fecha, se comunica atentamente que el comité conformado por los profesores firmantes, otorgamos nuestra autorización para que la estudiante imprima su trabajo final de tesis, y continúe con los trámites necesarios para la obtención del grado de maestría respectivo.

**ATENTAMENTE
 “AMOR, ORDEN Y PROGRESO”**

Tulancingo de Bravo, Hidalgo a 16 de octubre de 2023

Dra. Adriana Inés Rodríguez Hernández

Dra. Mayra Alejandra López Ortega

Dr. Norberto Chavarría Hernández

Dra. Ma del Rocío López Cuellar





Avenida Universidad Km. 1 s/n, Exhacienda Aquetzalpa,
 Tulancingo de Bravo, Hidalgo, México; C.P. 43600
 Teléfono +52 (771) 71 72000 ext. 2425
maestria_alimentos@uaeh.edu.mx

www.uaeh.edu.mx

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo y al Instituto de Ciencias Agropecuarias la oportunidad brindada para formarme dentro su Maestría en Ciencia de los Alimentos.

Agradezco al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (Conahcyt) la beca otorgada para los estudios de Maestría (1149260).

Mi sincero agradecimiento al Cuerpo Académico de Biotecnología Agroalimentaria la aceptación de realizar mi investigación en su grupo Académico, así como las facilidades otorgadas dentro y fuera del laboratorio.

Mi mayor agradecimiento a la Dra. Mayra Alejandra López Ortega por transmitirme la pasión y los conocimientos hacia el estudio de los microorganismos halófilos. Agradezco su paciencia, confianza, gentileza y tiempo brindado a lo largo de mi formación.

Agradezco a Sergio Alejandro May Rodríguez su paciencia, apoyo y esfuerzo brindado durante mi posgrado.

Finalmente agradezco al (a):

Dr. Víctor Manuel Martínez Juárez

Dr. Fermín Pérez Guevara

Dra. Rocío Yaneli Aguirre Loredó

Su apoyo en las investigaciones realizadas.

Le dedico esta Tesis a mi madre María Cristina Avilés Paredes, a mi padre Edgar Israel Escalante Pech, a mis hermanos Yolexochitl, Adriana, Iván, Alejandrina, Israel y Edgar, y a mi abuela Manuela Pech Sunza, quienes han sido mi fortaleza y mi mayor motivación para nunca desistir.

ÍNDICE GENERAL

Capítulo 1 INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVO GENERAL.....	4
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
JUSTIFICACIÓN	5
BIBLIOGRAFÍA.....	6
Capítulo 2 PRODUCCIÓN SIMULTÁNEA DE EXOPOLISACÁRIDOS (EPS) Y POLIHIDROXIALCANOATOS (PHA) sINTETIZADOS POR LA ARQUEA HALÓFILA <i>Haloferax mucosum</i>	7
2.1 INTRODUCCIÓN	8
2.2 ANTECEDENTES	10
2.2.1 HALÓFILOS.....	10
2.2.2 ARQUEAS HALÓFILAS	12
2.2.3 BIOPOLÍMEROS PRODUCIDOS POR HALÓFILOS.....	14
2.2.4 <i>Haloferax mucosum</i>	23
2.3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
2.3.1 MATERIALES	25
2.3.2 PRODUCCIÓN Y RECUPERACIÓN DEL EPS E IDENTIFICACIÓN DE LA ACUMULACIÓN DEL PHA.....	27
2.3.3 ANÁLISIS FISCOQUÍMICO DEL EXOPOLISACÁRIDOS (EPS) PRODUCIDO POR <i>Haloferax mucosum</i>	30
2.3.4 ESPECTROMETRÍA INFRARROJA CON TRANSFORMADA DE FOURIER (FT – IR) DEL EPS RECUPERADO	34
2.3.5 DETERMINACIÓN DE CARGA ELÉCTRICA DEL EPS MEDIANTE EL ESTUDIO DE POTENCIAL- ζ	34
2.3.6 PROPIEDADES REOLÓGICAS DEL EPS	35
2.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
2.4.1 COPRODUCCIÓN DE BIOPOLÍMEROS	36
2.4.2 MICROGRAFÍA FLUORESCENTE DE LAS CÉLULAS DE <i>Haloferax mucosum</i>	39
2.4.3 RENDIMIENTO DE PHA	41
2.4.4 CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA DEL EPS PRODUCIDO POR <i>Haloferax mucosum</i>	41
2.4.5 POTENCIAL- ζ	47
2.4.6 PROPIEDADES DE FLUJO.....	48
2.5 CONCLUSIONES	50
2.6 BIBLIOGRAFÍA.....	51

Capítulo 3 PRODUCCIÓN, RECUPERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS ARQUEALES PRODUCIDOS POR LA ARQUEA HALÓFILA <i>Haloferax mucosum</i>	56
3.1 INTRODUCCIÓN	57
3.2 ANTECEDENTES	58
3.2.1 POLIHIDROXIALCANOATOS (PHA)	58
3.2.2 ESTRUCTURA QUÍMICA	58
3.2.3 MÉTODO PARA LA DETECCIÓN DE MICROORGANISMOS PRODUCTORES Y NO PRODUCTORES DE PHA/PHB	59
3.2.4 RUTAS METABÓLICAS PARA LA PRODUCCIÓN DE PHA	60
3.2.5 PROPIEDADES DE LOS PHA	65
3.3 MATERIALES Y MÉTODOS	68
3.3.1 MICROORGANISMO PRODUCTOR Y MEDIO DE CULTIVO	68
3.3.2 DETECCIÓN DE ACUMULACIÓN DE GRÁNULOS DE PHA USANDO MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE FASES	69
3.3.3 RECUPERACION DEL PHA	70
3.3.4 ANÁLISIS QUÍMICO DEL POLIHIDROXIALCANOATO (PHA) PRODUCIDO POR <i>Haloferax mucosum</i>	71
3.3.5 PROPIEDADES TÉRMICAS DEL PHA	73
3.4 RESULTADOS Y DISCUSIONES	75
CRECIMIENTO DE <i>Haloferax mucosum</i> Y SÍNTESIS DE PHA	75
3.4.1 MICROGRAFÍA FLUORESCENTE DE LAS CÉLULAS DE <i>Haloferax mucosum</i> CRECIENDO EN MEDIO DE CULTIVO CON NaCl 4 M.	80
3.4.2 ESPECTROMETRÍA INFRARROJA CON TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR) DEL PHA RECUPERADO.	81
3.4.3 COMPOSICIÓN MONOMÉRICA DEL PHA PRODUCIDO POR <i>Haloferax mucosum</i>	83
3.4.4 MASA MOLAR	84
3.4.5 CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO	85
3.5 CONCLUSIONES	88
3.6 BIBLIOGRAFÍA	89
Capítulo 4 PERSPECTIVAS	93

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2-1. Coloración roja típica de algunos ambientes hipersalinos (A y B) ocasionada por la presencia de microorganismos halófilos. Real de Salinas, Celestún, Yucatán, México, (Fotografías tomadas por: Marianela Escalante Avilés).	11
Figura 2-2. Síntesis de EPS y PHA por <i>H. mediterranei</i> utilizando glucosa como fuente de carbono (Cui, Gong, Shi & Wang, 2017).	15
Figura 2-3. Topología de los exopolisacáridos (EPS) (ELM: Polisacáridos de liberación media; CPS: polisacáridos capsulares) en cultivos microbianos. Modificado de Padhan, 2021.....	17
Figura 2-4. Esquema general para la recuperación y purificación de EPS. (Tomado y modificado de Di Donato et al. (2016).	18
Figura 2-5. Fotografías de la arquea halófila <i>Haloferax mucosum</i> , crecida en medio sólido ATCC 2185, 2.5 M NaCl suplementado con glucosa e incubada a 37 °C, después de 48 h de crecimiento. A) Crecimiento de colonia mucoide; B) Vista de colonia mucoide con aumento 1000×; C) Células de <i>Haloferax mucosum</i> en tinción para halófilos (Fotografías tomadas por: Marianela Escalante Avilés).	23
Figura 2-6. Fotografías representativas del proceso de producción y recuperación de EPS. A) <i>Haloferax mucosum</i> creciendo en medio sólido ATCC 2185 (NaCl, 4M); B) Crecimiento de EPS en matraz bafleado de 500 mL; C) Biomasa y sobrenadante separados por centrifugación; D) y E) Sólidos insolubles en etanol; F) Deshidratación de sólidos insolubles con etanol absoluto.	28
Figura 2-7. Evolución de la concentración de biomasa y glucosa, en fermentaciones de <i>Haloferax mucosum</i> en medio ATCC2185 (2.5M NaCl, C/N=35).....	36
Figura 2-8. Cinética de <i>Haloferax mucosum</i> en medio ATCC 2185 (2.5 M, C/N 35). A) velocidad específica de crecimiento (μ); B) velocidad específica de consumo de glucosa (r_c).	38
Figura 2-9. Microfotografías de fluorescencia debido a la acumulación intracelular de PHA por <i>Haloferax mucosum</i> cuando crece en medio ATCC 2185 modificado (NaCl 2 M, C/N=35) a las: A) 32 h y B) 56 h de fermentación. PHA teñido con rojo Nilo (Aumento 400×).	40

Figura 2-10. Espectroscopía FTIR obtenida del EPS producido por <i>Haloferax mucosum</i>	43
Figura 2-11. Perfil de elución del: estándar de monosacáridos (MIX) (1: glucosa; 2: xilosa; 3: galactosa; 4: arabinosa; 5: ramnosa; 6: manosa); EPS 2M, monosacáridos constituyentes del EPS purificado después de hidrólisis ácida.	45
Figura 2-12. Potencial- ζ del EPS clarificado (1%) de <i>Haloferax mucosum</i> . Los datos representan el promedio de 9 muestras analizadas con sus desviaciones estándar.	48
Figura 2-13. Curva de flujo del EPS purificado producido por <i>Haloferax mucosum</i> (1%). La línea representa el ajuste a Modelo reológico de Ostwald de Waele.....	49
Figura 3-1. Rutas metabólicas para la síntesis de PHA en bacterias y haloarqueas, de acuerdo con Koller, 2019.....	61
Figura 3-2. Temperaturas de fusión de copolímeros de PHA (Noda, Lindsey, & Caraway, 2009).....	66
Figura 3-3. Fotografías representativas del proceso de producción y recuperación del PHA. A) <i>Haloferax mucosum</i> creciendo en medio líquido ATCC 2185 (NaCl, 4M); B) Separación de la biomasa del caldo de fermentación; C) Biomasa seca; D) Biomasa pulverizada; E) Biomasa resuspendida en cloroformo; F) Recuperación del PHA.....	71
Figura 3-4. Relación entre el crecimiento celular y el consumo de glucosa para <i>Haloferax mucosum</i> , cuando crece en medio modificado (ATCC 2185, NaCl 4 M, C/N= 48).....	75
Figura 3-5. Gráficos obtenidos de la fermentación de <i>Haloferax mucosum</i> en medio ATCC 2185 (4 M, C/N= 48). A) velocidad específica de crecimiento (μ); B) velocidad específica de consumo de glucosa (r_c).....	77
Figura 3-6. Caldo de la fermentación de <i>Haloferax mucosum</i> cuando crece en concentraciones de NaCl de: A) 2.5 M y B) 4 M.....	79
Figura 3-7. Microscopía de fluorescencia con contraste verde de las células no fijadas y teñidas con Rojo Nilo durante la producción de PHA en medio de cultivo ATCC2185 con NaCl (4 M) y relación de C/N 48, a los: A) 48 h y B) 96 h.	80
Figura 3-8. Espectro FT-IR de PHA producido por <i>Haloferax mucosum</i> en medio	

ATCC 2185 modificado A) NaCl 2.5 M, C/N=35, B) NaCl 4 M, C/N=48 y C) PHBV estándar. 82

Figura 3-9. Termogramas obtenidos por DCS de los PHA producidos por *Haloferax mucosum* en concentraciones de NaCl de: A) 2.5 M, B) 4 M, y C) PHB estándar. 86

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2-1. Clasificación de los microorganismos halófilos de acuerdo a sus requerimientos de NaCl para vivir (Rodríguez-Valera et al., 1982).	11
Tabla 2-2. Géneros arqueales dentro de las clases <i>Halobacteria</i> y <i>Metanomicrobiano</i> , y su código aceptado de tres letras (en algunos casos). Entre paréntesis se indica el número de especies halófilas dentro de cada género. Tomado de Litchfield (2011) y Ventosa et al., (2012).	13
Tabla 2-3. Resumen de estudios sobre la producción de exopolisacáridos (EPS) sintetizados por arqueas halófilas cultivadas en matraz agitado y biorreactor.	21
Tabla 2-4. Composición química del EPS producido por <i>Haloferax mucosum</i> cuando crece en matraz agitado orbitalmente y en medio ATCC 2185 modificado (NaCl 2.5 M, N/C=35).	44
Tabla 2-5. Composición monomérica (relación molar) del EPS producido por <i>Haloferax mucosum</i> y otras arqueas.	45
Tabla 2-6. Masa molecular promedio del exopolisacárido producido por <i>Haloferax mucosum</i> , dializado, clarificado y purificado, determinado por HPLC-SEC.	46
Tabla 3-1. Resumen de algunos estudios sobre la producción de polihidroxialcanoatos (PHA) acumulados por diferentes especies de arqueas halófilas en cultivo sumergido.	62
Tabla 3-2. Principales grupos funcionales encontrados en el PHA producido por <i>Haloferax mucosum</i>	81
Tabla 3-3. Porcentaje masa de PHB y PHV en el biopolímero producido por <i>Haloferax mucosum</i> en las dos condiciones de fermentación (2.5 y 4 M). Los datos presentados son el promedio de 6 réplicas*	83
Tabla 3-4. Peso molecular promedio en peso (M_w), Masa molar numérica (M_n) y el Índice de polidispersidad ($PDI = M_w/M_n$) de los PHA producidos por <i>Haloferax mucosum</i> en las dos concentraciones de NaCl 2.5 M (PHA ₁) y 4 M (PHA ₂), así como dos comparaciones con otras arqueas halófilas. Los resultados presentados son el promedio de 3 réplicas*	84
Tabla 3-5. Comparación de las propiedades térmicas del P(HB-co-HV) producido por algunas arqueas halófilas.	87

RESUMEN

El estudio de las arqueas halófilas y los metabolitos (primarios o secundarios) que producen en condiciones estresantes, no sólo son de interés científico, sino también tecnológico, ambiental e incluso comercial, gracias a las múltiples aplicaciones que éstos pueden tener. El objetivo de este trabajo fue evaluar la respuesta de *Haloferax mucosum* (DSMZ 27191) en el flujo de carbono hacia la producción de exopolisacáridos (EPS) y/o polihidroxicanoatos (PHA), modificando factores como la concentración de NaCl y la relación carbono/nitrógeno (C/N) en el medio de cultivo. Se evaluó la relación C/N 35 con NaCl 2.5 M. Se encontró que *Haloferax mucosum* es capaz de coproducir EPS y PHA en estas condiciones de crecimiento en donde la producción total de EPS alcanzó 1.57 g_{EPS}/g_{Biomasa} mientras que la acumulación de PHA fue de 0.011 g_{PHA}/g_{Biomasa}, ambos a las 144 h de fermentación.

El EPS fue analizado en su contenido de azúcares totales, proteína, grupos sulfatos y monosacáridos. Sus principales grupos funcionales se identificaron por espectroscopia de infrarrojo. La masa molar promedio, potencial zeta y las propiedades de flujo en solución acuosa también fueron determinadas. El contenido de azúcares, proteínas y grupos sulfatos, fue de 85.23 ± 0.04 %, 13.99 ± 0.08 %, 0.63 ± 0.03 % respectivamente. Dentro la estructura del EPS, se identificaron glucosa y galactosa, con el 36.19% y 18.24%, respectivamente, así como un tercer monosacárido no identificado. La masa molecular promedio (M_w) fue de 901.129 kDa. De igual manera, el EPS en solución acuosa (pH 4.5) presentó un valor de potencial zeta de -46.4 ± 1.3 , confirmando su naturaleza aniónica. EPS en solución presentó un comportamiento pseudoplástico, sus soluciones al 1% presentaron un índice de consistencia de 0.0347 Pas^{0.84} y un índice de flujo de 0.84.

Por otro lado, en fermentaciones con C/N = 48 y NaCl 4 M se benefició la vía metabólica para la producción del PHA, ya que con este medio de producción modificado, a las 96 h, se obtuvo un rendimiento de PHA por gramo de biomasa residual (X_r) de 0.13 g_{PHA}/g_{X_r}, mientras que la producción del EPS se vio nulificada. Se caracterizaron dos PHAs, siendo PHA₁ aquel que se obtuvo en condiciones de NaCl 2.5 M y C/N 35 y PHA₂ obtenido en concentraciones de NaCl 4 M y C/N 48. A través de cromatografía de gases se determinó que ambos PHA son copolímeros

de poli(3-hidroxi(3-hidroxi)butirato-co-3-hidroxi)valerato), con distinta proporción monomérica. El PHA₁ presentó el 99.16% de polihidroxi(3-hidroxi)butirato (PHB) y 0.38% de polihidroxi(3-hidroxi)valerato (PHV), mientras que para el PHA₂ se identificó un 98.58% de PHB y 1.4% de PHV. Las masas molares promedio (M_w) de los PHAs también mostraron diferencias, los valores fueron 232.8 y 605.5 kDa para PHA₁ y PHA₂, respectivamente. Los PHA se caracterizaron térmicamente a través de calorimetría diferencial de barrido, donde el PHA₂, presentó mayor contenido de PHV mostrando dos temperaturas de fusión (T_m) en el termograma a los 163.48 °C y 170.86 °C, con una entalpía de fusión (ΔH_m) de 89.609 J g⁻¹ y una temperatura de transición vítrea (T_g) de 57.83 °C. Los valores para PHA₁ fueron, $T_m = 167.98$ °C, $\Delta H_m = 75.27$ J g⁻¹, $T_g = 54.69$ °C. La cristalinidad de los dos polímeros se calculó con los datos de ΔH_m , los valores fueron 49.36 y 56.98% para PHA₁ y PHA₂, respectivamente.

ABSTRACT

The study of halophilic archaea and the metabolites (primary or secondary) they produce under stressful conditions are not only of scientific interest, but also technological, environmental and even commercial, thanks to the multiple applications they can have. The objective of this study was to evaluate the response of *Haloferax mucosum* (DSMZ 27191) in the carbon flux towards the production of exopolysaccharides (EPS) and/or polyhydroxyalkanoates (PHA), modifying factors such as NaCl concentration and carbon/nitrogen ratio (C/N) in the culture medium. The C/N 35 ratio with 2.5 M NaCl was evaluated. It was found that *Haloferax mucosum* is able to coproduce EPS and PHA in these growing conditions where the total EPS production reached 1.57 g_{EPS}/g_{Biomass} while the accumulation of PHA was 0.011 g_{PHA}/g_{residual biomass}, both at 144 h of fermentation.

The EPS was analyzed for its content of total sugars, protein, sulfate groups and monosaccharides. Its main functional groups were identified by infrared spectroscopy. The average molar mass, zeta potential, and flow properties in aqueous solution were also determined. The content of sugars, proteins and sulfate groups was 85.23 ± 0.04 %, 13.99 ± 0.08 %, 0.63 % respectively. Within the structure of EPS, glucose and galactose were identified, with 36.19% and 18.24%, respectively, as well as a third unidentified monosaccharide. The average molecular weight (M_w) was 901.129 kDa. Likewise, EPS in aqueous solution (pH 4.5) had a zeta potential value of -46.4 ± 1.3 , confirming its anionic nature. EPS in solution presented a pseudoplastic behavior, its 1% solutions presented a consistency index of 0.0347 Pas^{0.84} and a flow index of 0.84.

On the other hand, in fermentations with C/N = 48 and NaCl 4 M, the metabolic pathway for PHA production benefited, since with this modified production medium, at 96 h, a yield of PHA per gram of residual biomass (X_r) of 0.13 g_{PHA}/g_{X_r} was obtained, while EPS production was nullified. Two PHA were characterized, being PHA₁, was obtained under conditions of NaCl 2.5 M and C/N 35 and PHA₂ obtained at concentrations of NaCl 4 M and C/N 48 concentrations. Gas chromatography determined that both PHA are poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymers, with different monomeric proportions. PHA₁ had

99.16% of polyhydroxybutyrate (PHB) and 0.38% polyhydroxyvalerate (PHV), while PHA₂ had 98.58% of PHB and 1.4% PHV. The average molecular weight (M_w) also showed differences; the values were 232.8 and 605.5 kDa for PHA₁ and PHA₂, respectively. The PHA were thermally characterized through differential scanning calorimetry, where the PHA₂ presented a higher PHV content, showed two melting temperatures (T_m) in the thermogram at 163.48 °C and 170.86 °C, with a melting enthalpy (ΔH_m) of 89.609 J g⁻¹ and a glass transition temperature (T_g) of 57.83 °C. The values for PHA₁ were, $T_m = 167.98$ °C, $\Delta H_m = 75.27$ J g⁻¹ and $T_g = 54.69$ °C. The crystallinity of the two polymers was calculated with the ΔH_m data, the values were 49.36% and 56.98% for PHA₁ and PHA₂, respectively.

CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN

Los microorganismos que tienen la capacidad de sobrevivir y crecer en condiciones ambientales que resultan inhabitables para otros, se denominan extremófilos. En los últimos lustros, han incrementado los estudios de los microorganismos extremófilos, particularmente de aquellos pertenecientes al dominio *Archaea*, en un principio conducidos desde el punto de vista evolutivo, pero también debido a los metabolitos producidos por sus miembros para adaptarse a los nichos extremos que éstos habitan. Dentro de estos mecanismos de adaptación se encuentra la síntesis de sustancias endo- y exo-poliméricas de las cuáles se ha hipotetizado y comprobado que comparten la robustez del microbio productor. Por tanto, el estudio de las arqueas se ha convertido en un tema de interés científico, tecnológico, comercial, ambiental, etc.

En los ambientes hipersalinos como el Mar Muerto, el Gran Lago Salado (EUA), el Salar de Uyuni (Bolivia), Guerrero Negro (México) y las salinas, sólo los halófilos son capaces de proliferar ([Oren, 2002](#)), requiriendo concentraciones entre 1.5 y hasta 5 M de NaCl ([Litchfield, 2011](#)). Las arqueas halófilas pertenecen a la familia *Halobacteriaceae*, la cual está compuesta por 40 géneros y 144 especies, dentro de los cuales, en algunas cepas se ha puesto en evidencia su capacidad para producir moléculas de interés biotecnológico, como son enzimas estables a baja actividad de agua, bacterioruberinas, bacteriorodopsinas, isoprenoides, halocinas (péptidos antimicrobianos), exopolisacáridos (EPS) y polihidroxicanoatos (PHA), lo cual ha incrementado el interés en su exploración y explotación. Estos últimos, los EPS y los PHA, se caracterizan por su diversidad funcional gracias a su estructura. Particularmente, algunas especies de arqueas halófilas de los géneros *Haloferax*, *Haloarcula*, *Haloterrigena*, *Halorubrum*, y *Halogeometricum* se han descrito como productoras de PHA y EPS, e incluso, algunas tienen la capacidad de coproducir ambos biopolímeros de manera paralela ([Koller, 2015](#); [López-Ortega et al., 2020](#); [Mata et al., 2006](#); [Poli et al., 2009](#)).

De manera natural, las haloarqueas producen estos biopolímeros como

reserva de carbono y energía, pero también como medida de supervivencia a factores ambientales que causan estrés a la célula, como son elevada presión osmótica, deshidratación y exposición a la radiación UV (Obruca, Sedlacek, & Koller, 2021). A nivel laboratorio, para inducir la síntesis de PHA y/o EPS, es común recurrir a la modificación de factores ambientales relacionados al estrés como cambios en el pH, temperatura, fuente de carbono, relación de carbono-nitrógeno (C/N), velocidad de agitación, presión osmótica, entre otros, y estos cambios, tienen alto impacto sobre la producción, rendimientos, composición química y estructural de estos biopolímeros.

Haloferax mucosum es una arquea halófila aislada en el ambiente hipersalino de Hamelin Pool, Shark Bay, Australia (Allen et al., 2008). Esta arquea es capaz de sintetizar 7.15 ± 0.44 g/L de EPS, que exhibe diferentes propiedades tecno-funcionales (i.e. modificador de viscosidad, disminuye la tensión superficial del agua y estabilizante de emulsiones). Esta capacidad de producción de EPS fue comprobada, caracterizada y reportada por López-Ortega et al. (2020). Además, el EPS arqueal, actúa como estabilizante de emulsiones sobre diferentes compuestos hidrófobos como hexano, queroseno, cloroformo, aceite mineral y aceite de ricino, sin la incorporación de tensioactivos químicos. Ensayos de actividad emulsificante y comportamiento viscoelástico corroboran la capacidad del EPS arqueal para formar emulsiones altamente estables usando concentraciones menores de polisacárido (0.32 %, p/v) con respecto a otros polisacáridos frecuentemente usados, como la goma Arábiga (4.0%, p/v). Asimismo, se ha comprobado que los EPS de *Haloferax mucosum* son estables a altas temperaturas (hasta 100 °C) durante tiempos prolongados de exposición (1 h), a altas concentraciones de NaCl (hasta 4 M) y en solución a pH ácidos o alcalinos (López-Ortega et al., 2020).

Estas propiedades, demuestran la existencia de una macromolécula robusta con posibles aplicaciones en las industrias alimentaria, farmacéutica, cosmética y/o de cuidado personal. Estas características peculiares de estabilidad pueden contribuir a corto o mediano plazo a reducir la brecha existente entre los rudos procesos industriales y la inestabilidad de las moléculas biológicas.

Por otro lado, en estudios desarrollados por el Cuerpo Académico de Biotecnología Agroalimentaria, se ha comprobado que esta arquea paralelamente acumula de manera intracelular poliésteres de PHA. Por tanto, se planteó la hipótesis de que es posible co-producir EPS y PHA a partir del cultivo sumergido de *Haloferax mucosum*, en respuesta a la modificación del medio de cultivo y a las condiciones de producción. Hasta nuestro conocimiento, no existen reportes de la producción de PHA por *Haloferax mucosum*.

El propósito de esta investigación fue evaluar la respuesta de *Haloferax mucosum* (DSMZ 27191) en el flujo de carbono hacia la producción de EPS y/o PHA, modificando factores como concentración de NaCl y relación molar C/N. Una vez obtenidos los productos de interés, se caracterizaron química y macromolecularmente.

Los resultados se presentan en dos capítulos, el primero relacionado a la coproducción de los biopolímeros sintetizados por *Haloferax mucosum* y la caracterización fisicoquímica del EPS; y el segundo está relacionado a la producción, recuperación y caracterización de los PHA obtenidos.

OBJETIVO GENERAL

1. Coproducir y caracterizar endo- y exo-polímeros arqueales a partir del cultivo sumergido de la arquea halófila *Haloferax mucosum*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el efecto de la relación C/N sobre la coproducción de polisacáridos extracelulares (EPS) y polihidroxialcanoatos (PHA) sintetizados por la arquea halófila *Haloferax mucosum* en cultivo a nivel matraz.
2. Después de determinar la mejor relación C/N para coproducir EPS y PHA, realizar la caracterización químico-macromolecular del EPS producido por *Haloferax mucosum*.
3. Determinar las condiciones adecuadas (referentes a relación C/N, salinidad y contenido de extracto de levadura) para obtener alta producción de PHA por *Haloferax mucosum*, en fermentaciones a nivel matraz agitado.
4. Realizar la caracterización química y térmica de los PHA arqueales producidos.

JUSTIFICACIÓN

El estudio de los microorganismos y la producción de sus metabolitos ha tomado importancia en la mayoría de las industrias como farmacéutica, petroquímica, medicina, agroindustrial, biorremediación, forestal y por supuesto en la industria de los alimentos. Los metabolitos microbianos son diversos y han sido ampliamente utilizados para cubrir las necesidades humanas. En el sector alimentario, existen diversos ejemplos de metabolitos microbianos usados desde la antigüedad, ya sea producidos y consumidos de forma directa con el alimento (ácidos, péptidos, compuestos aromáticos, alcoholes, etc., en alimentos fermentados), adicionados para mejorar su reología, estabilidad o propiedades organolépticas (espesantes, emulsificantes, gelificantes, pigmentos, estabilizantes, etc.), o como películas o recubrimientos alimentarios (biopolímeros formadores de películas o bioplásticos).

Se ha comprobado que las arqueas halófilas tienen la versatilidad de coproducir de manera simultánea polisacáridos extracelulares que tienen amplia aplicación en alimentos como tensioactivos, emulgentes, espesantes, entre otras; así como bioplásticos, como los polihidroxicanoatos, que han sido propuestos como alternativa interesante para combatir los problemas ocasionados por sus contrapartes de la industria petroquímica. Aunque estas arqueas halófilas son microorganismos raramente explorados, los metabolitos derivados de ellas las hacen interesantes para su estudio, es por ello que el presente trabajo propone el estudio de la coproducción de bioplásticos y exopolisacáridos producidos por la arquea halófila *Haloferax mucosum*, así como su caracterización fisicoquímica y macromolecular, para contribuir en el desarrollo de nuevos biopolímeros para aplicaciones biotecnológicas diversas.

BIBLIOGRAFÍA

- Allen, M. A., Goh, F., Leuko, S., Echigo, A., Mizuki, T., Usami, R., . . . Burns, B. P. (2008). *Haloferax elongans* sp. nov. and *Haloferax mucosum* sp. nov., isolated from microbial mats from Hamelin Pool, Shark Bay, Australia. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 58(Pt 4), 798-802. doi:10.1099/ijs.0.65360-0
- Koller. (2015). Study on the Production and Re-use of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and Extracellular Polysaccharide by the Archaeon *Haloferax mediterranei* Strain DSM 1411. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 29(2), 87-98. doi:10.15255/cabeq.2014.2058
- Litchfield, C. D. (2011). Potential for industrial products from the halophilic Archaea. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38(10), 1635.
- López-Ortega, M. A., Rodríguez-Hernández, A. I., Camacho-Ruiz, R. M., Córdova, J., López-Cuellar, M. D. R., Chavarría-Hernández, N., & González-García, Y. (2020). Physicochemical characterization and emulsifying properties of a novel exopolysaccharide produced by haloarchaeon *Haloferax mucosum*. *International journal of biological macromolecules*, 142, 152-162. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.09.087
- Mata, J. A., Béjar, V., Llamas, I., Arias, S., Bressollier, P., Tallon, R., . . . Quesada, E. (2006). Exopolysaccharides produced by the recently described halophilic bacteria *Halomonas ventosae* and *Halomonas anticariensis*. *Research in Microbiology*, 157(9), 827-835.
- Obruca, S., Sedlacek, P., & Koller, M. (2021). The underexplored role of diverse stress factors in microbial biopolymer synthesis. *Bioresource Technology Reports*, 326, 124767.
- Oren, A. (2002). Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology reports*, 28, 56-63.
- Poli, Kazak, H., Gürleyendağ, B., Tommonaro, G., Pieretti, G., Öner, E. T., & Nicolaus, B. (2009). High level synthesis of levan by a novel *Halomonas* species growing on defined media. *Carbohydrate Polymers*, 78(4), 651-657. doi:10.1016/j.carbpol.2009.05.031

CAPÍTULO 2
PRODUCCIÓN SIMULTÁNEA DE EXOPOLISACÁRIDOS
(EPS) Y POLIHIDROXIALCANOATOS (PHA)
SINTETIZADOS POR LA ARQUEA HALÓFILA *Haloferax*
mucosum

2.1 INTRODUCCIÓN

La capacidad que tienen los extremófilos para resistir y proliferar en condiciones extremas a menudo se debe a la producción de diversos biopolímeros, ya sean macromoléculas extra- o intracelulares, que son capaces de brindar a la célula defensas contra el estrés ambiental, por ejemplo, ayudándola a la adhesión a superficies, barreras protectoras, activación de la comunicación celular (*Quorum Sensing*), competitividad, entre otras (Kalita & Joshi, 2017). Lo interesante de estas moléculas biopoliméricas es su compatibilidad y competitividad con otros polímeros de gran interés en la industria, lo que los convierte en macromoléculas interesantes comercialmente. Entre los biopolímeros naturales más destacados se encuentran los exopolisacáridos (EPS) y polihidroxicanoatos (PHA) intracelulares (Finore, Lama, Poli, Di Donato, & Nicolaus, 2015).

Diferentes bacterias halófilas del género *Halomonas* (*H. maura*, *H. almeriensis*, *H. eurihalina*, entre otros) Salipiger, *Chromohalobacter*, *Arthrobacter*, *Salibacterium* (López-Ortega et al., 2022), y en menor cantidad algunas especies de arqueas del género *Haloferax* han sido reportadas como coproductores de EPS y biopolíesteres de polihidroxicanoato (PHA), cabe destacar que los reportes de acumulación de PHA han sido abordados únicamente desde el punto de vista en la mejora de condiciones de producción, ya sea en biorreactor o a nivel matraz; sin embargo, la literatura sobre la caracterización química y térmica de los PHA arqueales es aún escasa (Finore, Lama, Poli, Donato, & Nicolaus, 2015; López-Ortega, Chavarría-Hernández, López-Cuellar, & Rodríguez-Hernandez, 2021).

Haloferax mucosum (DMS 27191) fue aislada de tapetes microbianos de Hamelin Pool, Shark Bay (Australia) y está clasificada como una arquea (haloarquea) extremadamente halófila (Allen et al., 2008). De igual manera, *Haloferax mucosum* ha sido reportada como productora y fuente novedosa de polisacáridos extracelulares (EPS) y existen algunos estudios preliminares sobre la producción de EPS a nivel matraz y sus propiedades fisicoquímicas y emulsificantes (López-Ortega et al., 2020). Sin embargo, aún existe un panorama muy amplio en el estudio de la producción de EPS y los plásticos intracelulares de este microorganismo halófilo.

Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la relación carbono/nitrógeno (C/N) y el contenido de NaCl, en la producción de PHA y EPS por la arquea halófila *Haloferax mucosum*; así como establecer protocolos de recuperación de los biopolímeros producidos para su posterior caracterización química y macromolecular.

2.2 ANTECEDENTES

2.2.1 HALÓFILOS

Los hábitats hipersalinos presentan altas concentraciones de sales inorgánicas; estos ambientes se dividen en *thalassohalinos* y *athalassohalinos*. Los *thalassohalinos* contienen hasta un 35% de sal, en donde el catión Na^+ y el anión Cl^- predominan. En los ambientes *athalassohalinos* (agua hipersalinas que no se originan por el agua de mar) abundan los iones K^+ , Mg^+ , Na^+ y el catión HCO_3^- (Ventosa, Márquez, Sánchez-Porro, & de la Haba, 2012).

Los lagos hipersalinos con concentraciones de sal superiores a 250 g/L se caracterizan por albergar comunidades muy densas de microorganismos que imparten una coloración roja a las salmueras [Figura 2-1](#). Estos microorganismos nativos de los ambientes salinos (i.e lagos y suelos salinos, salinas marinas y varios otros hábitats hipersalinos) se denominan halófilos y son organismos que se han adaptado a vivir no solo a concentraciones moderadas y altas de sal, sino a otros factores ambientales que las someten a estrés, como valores de pH alcalinos, baja disponibilidad de oxígeno y agua, variaciones de temperatura, radiación UV, etc. Estos microorganismos se encuentran dentro de los tres dominios de la vida: *Archaea*, *Bacteria* y *Eukarya* (Finore, Lama, Poli, Di Donato, et al., 2015; López-Ortega et al., 2021; Vreeland, 2012).

Los microbios halófilos requieren preferentemente más el 3 % p/v de sal para su crecimiento óptimo, comúnmente se han diferenciado dos grupos fisiológicos de microorganismos halófilos; las bacterias halófilas pueden sobrevivir en un rango de concentraciones de NaCl entre 3 al 15 % p/v; y las arqueas halófilas (haloarqueas) que crecen en ambientes hipersalinos con un intervalo del 15 al 32 % de salinidad (Vreeland, 2012).

Kushner en 1985 propuso la clasificación de los microorganismos de acuerdo a sus requerimientos de NaCl ([Tabla 2-1](#)) (Rodríguez-Valera, Juez, & Kushner, 1982).



Figura 2-1. Coloración roja típica de algunos ambientes hipersalinos (A y B) ocasionada por la presencia de microorganismos halófilos. Real de Salinas, Celestún, Yucatán, México, (Fotografías tomadas por: Marianela Escalante Avilés).

Tabla 2-1. Clasificación de los microorganismos halófilos de acuerdo a sus requerimientos de NaCl para vivir (Rodríguez-Valera et al., 1982).

Clasificación	Concentración DE NaCl (%, p/v) para crecimiento óptimo
Halófilos extremos	15 – 36 % (2.5 y 6.2 M)
Halófilo moderado	3 – 15 % (0.5 y 2.5 M)
Halófilo débil	1 – 3 % (0.2 y 0.5 M)

A principios de la década de los 80's, los microorganismos halófilos empezaron a tomar gran importancia biotecnológica. A diferencia de otras arqueas, las haloarqueas tienen diversas ventajas al momento de trabajar con ellas, por ejemplo, gracias a la alta presión osmótica a la cual pueden vivir y desarrollarse, se impide que otros microorganismos se propaguen en el medio de cultivo, lo que favorece un buen proceso de fermentación y disminuye los requerimientos estrictos de esterilidad para trabajar (algo imposible para microorganismos mesófilos, por ejemplo) (Ventosa & Nieto, 1995).

2.2.2 ARQUEAS HALÓFILAS

Las arqueas halófilas extremas están consideradas como las procariotas mejor adaptadas a altas concentraciones de NaCl, desde 8% (1.4 M) hasta aproximadamente concentraciones saturadas de esta sal (36% o 6.2 M), sin poder crecer en medios de agua dulce. Se encuentran incluidas en el filo *Euryarchaeota* y están representadas por las arqueas halófilas extremadamente aeróbicas, también designadas como haloarchaea, actualmente éstas se incluyen dentro de la clase *Halobacteria*. A excepción de algunas especies de *Natrialba*, la mayoría de las haloarqueas producen colonias de pigmentación roja a rosada debido a la presencia de carotenoides C₅₀ denominados bacteriorrubinas lo que las hace parcialmente responsables de las pigmentaciones rosadas de los lagos y estanques altamente salinos (Grant, 2001).

Debido a que la disponibilidad de nutrientes es escasa en el hábitat natural de estas arqueas halófilas, sus demandas nutricionales son bajas. Generalmente prefieren fuentes simples de carbono y de energía, ya sea aminoácidos, ácidos grasos o azúcares. Para cultivarlas en laboratorio se requiere de medios complejos constituidos de diferentes sales en distintas proporciones, típicamente se requiere la presencia de NaCl, KCl, MgSO₄, CaCl₂ y fuentes complejas de nitrógeno y carbono como son casaminoácidos, extracto de levadura, triptona y/o peptona (Vreeland, 2012).

Las haloarqueas tienen características típicas de las arqueas, como la presencia de grupos éter entre glicerol y los lípidos en su membrana, lo cual le proporciona más estabilidad química a ésta, no son formadoras de esporas ni patógenas y no contienen peptidoglicano en su membrana, lo que las vuelve diferentes del dominio *Bacteria*, además de sus evidentes diferencias filogenéticas de acuerdo con el marcador universal 16S de ARN. En la [Tabla 2-2](#), se observa la clasificación de la clase haloarqueas y en algunos casos los códigos de aceptación conformados de 3 letras ([Litchfield, 2011](#); [Ventosa et al., 2012](#)).

Tabla 2-2. Géneros arqueales dentro de las clases *Halobacteria* y *Metanomicrobiano*, y su código aceptado de tres letras (en algunos casos). Entre paréntesis se indica el número de especies halófilas dentro de cada género. Tomado de [Litchfield \(2011\)](#) y [Ventosa et al., \(2012\)](#).

Clase: <i>Metanomicrobiano</i>	Género: <i>Methanohalobium</i> (1), <i>Methanocalculus</i> (1), <i>Methanohalophilus</i> (3), <i>Methanosalsum</i> (1)
Filo: <i>Euryarcheota</i> Clase: <i>Halobacteria</i>	Género: <i>Halobacterium</i> Hbt. (4), <i>Haladaptatus</i> Hap (3), <i>Halalkalicoccus</i> Hac. (2), <i>Halarchaeuma</i> (1), <i>Haloarcula</i> Har. (7), <i>Halobaculum</i> Hbl. (1), <i>Halobiforma</i> Hbf. (3), <i>Halococcus</i> Hcc. (7), <i>Haloferax</i> Hfx. (11), <i>Halogeometricum</i> Hgm. (1), <i>Halogranumb</i> (1), <i>Halomicrobium</i> Hmc. (2), <i>Halonotiusc</i> (1), <i>Halopelagiusd</i> (1), <i>Halopiger</i> Hpg. (2), <i>Haloplanus</i> Hpm. (1), <i>Haloquadratum</i> Hqr. (1), <i>Halorhabdus</i> Hrd. (2), <i>Halorubrum</i> Hrr. (24), <i>Halorussuse</i> (1), <i>Halosarcina</i> Hsc. (1), <i>Halosimplex</i> Hsx. (1), <i>Halostagnicola</i> Hts. (1), <i>Haloterrigena</i> Htg. (8), <i>Halovivax</i> Hvx. (2), <i>Natrialba</i> Nab. (6), <i>Natrinema</i> Nnm. (6), <i>Natronoarchaeumf</i> (1), <i>Natronobacterium</i> Nbt. (1), <i>Natronococcus</i> Ncc. (3), <i>Natronolimnobi</i> Nlm. (2), <i>Natronomonas</i> Nmn. (2), <i>Natronorubrum</i> Nrr. (4), <i>Salarchaeumg</i> (1)

2.2.3 BIOPOLÍMEROS PRODUCIDOS POR HALÓFILOS

Las haloarqueas han desarrollado estrategias de adaptación química, lo que les permite compensar los efectos perjudiciales de las condiciones extremas manteniendo así su integridad celular. Parte de estas estrategias es la producción de agregados multicelulares, comúnmente referidos como biopelículas; o la biosíntesis de extremo-enzimas que retienen su actividad catalítica en condiciones de estrés ambiental (pH, temperatura, presión, salinidad, baja actividad de agua etc.) (Flemming, 2011; Padhan, 2021). Estos consorcios microbianos se encuentran en una matriz extracelular que rodean a la mayoría de las células microbianas, le ayuda como mecanismo de protección y está constituida principalmente de polisacáridos (40% – 95%), proteínas (1% - 60%), ácidos nucleicos (1% - 10%) y lípidos (1% - 40%) (Flemming, 2010; Sutherland, 2001).

Una gran variedad de microbios secreta exopolisacáridos (EPS), pero factores como el contenido de carbono y nitrógeno, pH, temperatura, salinidad o velocidad de agitación, pueden modificar el rendimiento y propiedades fisicoquímicas del EPS excretado por estos microorganismos (Padhan, 2021).

Además, varios extremófilos también son capaces de sintetizar polímeros intracelulares conocidos como polihidroxicanoatos (PHA), que se producen como compuestos para el almacenamiento de carbono y energía, y como mecanismo de protección para hacer frente a las adversidades ambientales (López-Ortega et al., 2021; Obruca et al., 2021; Padhan, 2021).

Sin embargo, existe una competencia entre la biosíntesis de EPS y PHA, pero su producción dependen de la energía y el poder reductor derivados de la degradación de las fuente de carbono, las cuales se ven obligadas a dividirse en dos procesos biológicos para poder producir ambos biopolímeros (Shi, Lee, & Ma, 2007). La ruta metabólica para sintetizar el exopolisacáridos es más compleja y por ello hay un mayor desgaste energético a diferencia de la acumulación intracelular del polihidroxicanoato. En la [Figura 2-2](#) se muestra una ruta metabólica hipotética de síntesis de EPS y PHA para *H. mediterranei* propuesta por Cui et al. (2017).

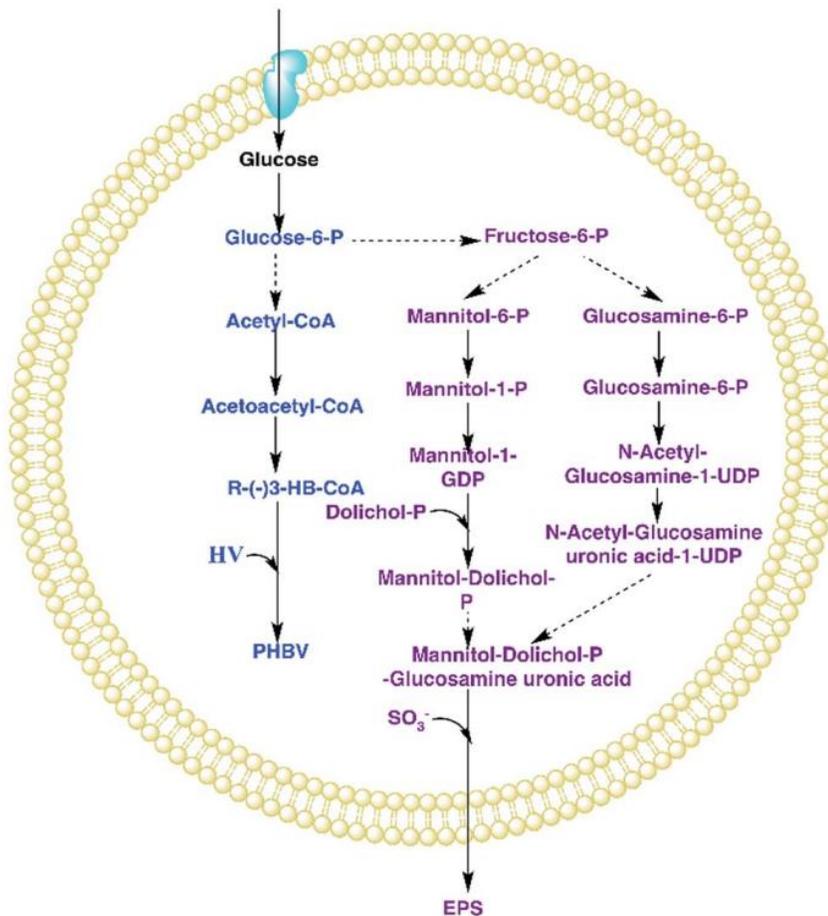


Figura 2-2. Síntesis de EPS y PHA por *H. mediterranei* utilizando glucosa como fuente de carbono (Cui, Gong, Shi & Wang, 2017).

2.2.3.1 Polihidroxicanoatos (PHA)

Los PHA son poliésteres producidos por la fermentación de azúcares y lípidos. Estas macromoléculas simples son sintetizadas por una amplia gama de microorganismos. Los PHA se acumulan intracelularmente y funcionan como reservas de carbono y energía. Las moléculas de PHA, extraídas de la célula bacteriana, tienen una masa molar suficientemente alta y exhiben características similares a algunos plásticos petroquímicos comunes, por ejemplo, polietileno y polipropileno (Kalita & Joshi, 2017). La mayoría de los PHA se identifican principalmente como poliésteres lineales compuestos de monómeros de ácidos

grasos 3- hidroxil (Madison & Huisman, 1999). En estos PHA, el grupo carboxilo e hidroxilo de los monómeros vecinos forman un enlace éster.

Como regla general, los PHA se clasifican en función del número de átomos de carbono en la cadena polimérica. Los PHA que constan de tres a cinco átomos de carbono en la cadena del polímero se clasifican como PHA de cadena corta (scl-PHA); los PHA conformados de 6 a 14 átomos de carbono se clasifican como cadena media (mcl-PHA) (Kim & Rhee, 2000; Madison & Huisman, 1999). Además, como todos los polímeros, los PHA también se pueden clasificar como homopolímeros o heteropolímeros según el número de tipos diferentes de monómeros de hidroxialcanoato que componen la unidad monomérica. En cuanto a sus propiedades materiales, los scl-PHA muestran ser termoplásticos, mientras que los mcl-PHA son más elásticos.

Los PHA se consideran altamente biodegradables en una variedad de entornos naturales. En general, la biodegradabilidad de los materiales de PHA depende de (i) la capacidad de las bacterias de secretar enzimas que degradan el PHA, (ii) la estructura del material resultante y (iii) el tipo de polímero, ya que se ha demostrado que los copolímeros de PHA se degradan más rápido que los homopolímeros (Kunioka & Kawaguchi, 1989). En el *Capítulo 3* se describe a mayor profundidad la producción de PHA a partir de microorganismos halófilos.

2.2.3.2 Exopolisacáridos (EPS)

Los EPS juega un rol como material de reserva de energía y agente de defensa, también ayuda a la célula a realizar diferentes funciones, como la regulación osmótica, simbiosis y otras funciones vitales para el microorganismo, desde la adaptación hasta la reproducción (Poli et al., 2018). La biosíntesis y acumulación del polisacárido tiene lugar después de la fase de crecimiento del microorganismo (Donot, Fontana, Baccou, & Schorr-Galindo, 2012). Este proceso biosintético obliga al microorganismo a invertir hasta el 70% del carbono consumido en la producción del EPS. En general, los EPS producidos se presentan en dos formas, a saber, exopolisacáridos de liberación media (ELM) y polisacáridos capsulares (CPS). Los polímeros se unen de forma covalente a la superficie celular

en los CPS, mientras que en el caso de los ELM se unen de forma laxa a la superficie celular o se encuentran en el medio extracelular como matriz amorfa o incrustados en biopelículas (Padhan, 2021). La Figura 2-3 esquematiza la organización de los ELM y CPS en cultivos microbianos.

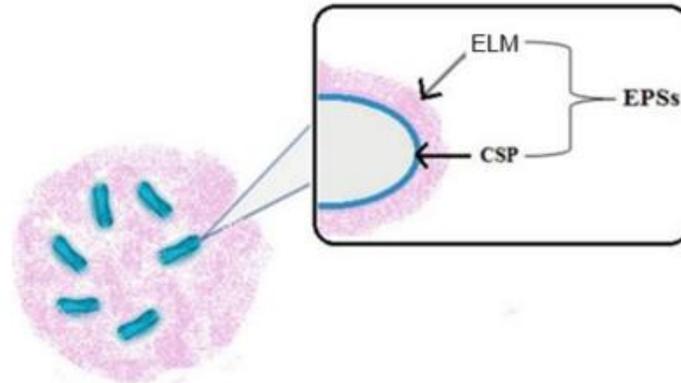


Figura 2-3. Topología de los exopolisacáridos (EPS) (ELM: Polisacáridos de liberación media; CPS: polisacáridos capsulares) en cultivos microbianos. Modificado de Padhan, 2021.

Los polisacáridos microbianos son polímeros de carbohidratos con masas molares grandes (50 a 2000 kDa). Se componen de uno o varios tipos de monosacáridos, por lo que se clasifican como homopolisacáridos o heteropolisacáridos, respectivamente. Estas unidades monoméricas podrían ser pentosas, hexosas, desoxihexosas, aminoazúcares o ácidos urónicos. Sin embargo, los monosacáridos más reconocidos que conforman su estructura son manosa y glucosa (Joulak et al., 2019). Asimismo, los EPS puede contener muchos otros sustituyentes no carbohidratos como fosfatos, sulfatos, lactatos, ácidos nucleicos, proteínas y lípidos unidos a la cadena principal del polisacárido. La Figura 2-4 describe las principales estrategias experimentales que se han desarrollado para extraer y purificar EPS.

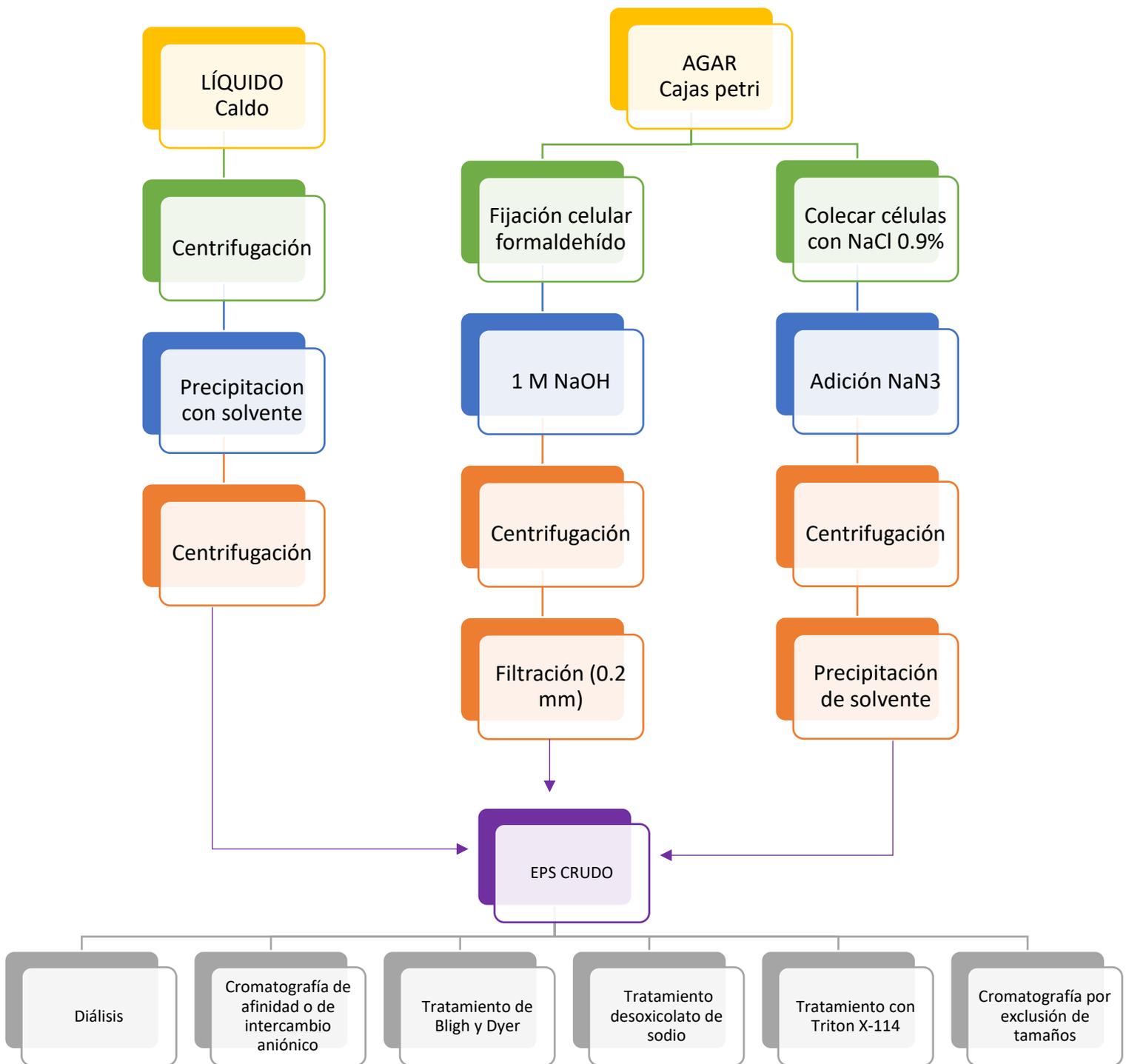


Figura 2-4. Esquema general para la recuperación y purificación de EPS. (Tomado y modificado de Di Donato et al. (2016).

Las interacciones electrostáticas entre partícula-partícula y partícula-medio que pueden formar los EPS, son factores de interés cuando se obtiene un nuevo material con capacidad emulsificante/viscosificante, pues de esto depende estrechamente su estabilidad, el comportamiento reológico, la sedimentación, la redispersión, entre otros factores, debido a que estas interacciones dan lugar a la formación de flóculos, geles fuertes o débiles o redes con poca solubilidad en ambientes acuosos (Cano-Sarmiento et al., 2018; Nicolaus, Kambourova, & Oner, 2010). Gracias a estos factores y a sus características químicas como masa molar grande, su naturaleza polielectrolítica y presencia de grupos hidrófobos, promueven las actividades interfaciales en un sistema disperso y/o retardar la coalescencia de la fase dispersa en emulsiones aceite – agua (Kalita & Joshi, 2017) u otros compuestos orgánicos de naturaleza hidrófoba.

El estudio de la biosíntesis del EPS ha sido reportado para diversas arqueas halófilas, los datos reportados en la [Tabla 2-3](#) se enfocan principalmente en la producción, caracterización y propiedades polifuncionales del mismo, los cuales varían de un microorganismo a otro dependiendo de las condiciones de fermentación, fuentes de carbono/nitrógeno y otros factores. Como se observa, las producciones máximas reportadas de EPS arqueales difieren según la arquea, sin embargo, los tiempos de producción son prolongados y las recuperaciones varían desde 0.03 hasta 7 g/L; no obstante, las propiedades tecno-funcionales y biológicas de estos EPS los hacen biomoléculas promisorias en el área biotecnológica.

Los EPS han mostrado capacidad para absorber, adsorber, transformar o degradar compuestos xenobióticos, por lo que han sido usados en biorremediación (Kalita & Joshi, 2017). Por ejemplo, el EPS producido por *Haloterrigena turkmenica* (DSM-5511) aislado por el grupo de Squillaci et al. (2016), mostró capacidad de atrapamiento de hidrocarburos policíclicos aromáticos y/o compuestos orgánicos volátiles, como el tolueno y xileno, causantes de contaminación ambiental.

Los EPS además presentan propiedades bioactivas como la actividad inmunomoduladora, que es otra de las propiedades que presentan los EPS sintetizados por los extremófilos. Se ha discutido que las características

estructurales como la masa molecular, el grado de ramificación y la rigidez de la cadena de estos EPS pueden modular la respuesta del sistema inmunitario activando diferentes células inmunitarias (Kalita & Joshi, 2017). Algunos otros EPS arqueales presentan actividad antimicrobiana, antimicótica, antiviral y antioxidante (López-Ortega et al., 2021; Sarilmiser, Ates, Ozdemir, Arga, & Oner, 2015; Squillaci et al., 2016). El EPS producido por *Haloterrigena turkmenica* (DSM-5511) mostró capacidades antioxidantes en concentración de 10 mg/mL con una inhibición del radical DPPH de hasta el 62% (Squillaci et al., 2016). Otra actividad biológica interesante reportada recientemente por Hamidi et al. (2019) es la actividad anticancerígena del heteropolisacárido producido por *Halorubrum* sp. (TBZ112) que demostró actividad antiproliferativa contra células MKN-45, responsables del cáncer gástrico humano, así mismo, demostraron que su empleo no causa citotoxicidad en líneas celulares de fibroblastos dérmicos, lo cual resalta su biocompatibilidad con células humanas. En estudios *in vitro* realizados por Xu et al. (2022), se reportó la actividad antiviral contra SARS-CoV-2 y actividad anti-infectiva de células de riñón en dosis de 11.1 $\mu\text{g/mL}$ de los EPS sulfatados producidos por *Haloarcula hispánica* (ATCC33960) (ver Tabla 2-3). La actividad antiviral se atribuye a que el EPS puede unirse a la glicoproteína estructural *Spike* del SARS-CoV-2; la proteína *Spike* es una estructura que cubre la superficie de cada virión, la cual es responsable de la entrada del virus en la célula huésped. La unión EPS-glicoproteína *Spike* inhibe la unión a la proteína *Spike* de células epiteliales del riñón Verp-E6 y a las células epiteliales bronquiales BEAS-2b, impidiendo la infección de pseudovirus del SARS-CoV-2.

Tabla 2-3. Resumen de estudios sobre la producción de exopolisacáridos (EPS) sintetizados por arqueas halófilas cultivadas en matraz agitado y biorreactor.

Microorganismo Halófilo	<i>Haloterrigena turkmenica</i> (DSM-5511)	<i>Haloferax mediterranei</i> (ATCC 33500)	<i>Haloferax mediterranei</i> (DSM 1411)	<i>Haloferax mediterranei</i> (ATCC 33500)
Fuente de carbono y nitrógeno	Glucosa, Manosa, Galactosa, Fructosa, Sacarosa Extracto de levadura	Glucosa Extracto de levadura	Glucosa Extracto de levadura	Glucosa
Condiciones de fermentación	<ul style="list-style-type: none"> - Matraz agitado - Preinóculo 37°C y 180 rpm - Medio M372 (g/L): E.L. (1), casaminoácidos (5), Glutamato de sodio (1), KCl (2), Na₃-citrato (3), MgSO₄·7H₂O (20), FeCl₂·4H₂O (0.036), MnCl₂·4H₂O (0.00036), fuente de carbono adicionada al 1% (p/v) Medio de producción M372 con glucosa (1%) en matraz de 2 L 	<ul style="list-style-type: none"> - Matraz cilíndrico de 25 L que contenían 20.5 de medio mínimo. Cultivo por Lote - Inóculo (1%, v/v) - 40 °C, 550 rpm, 38 °C y aeración (100% saturación de O₂). - Medio de producción: Medio mínimo (g/L): sales marinas (25), FeCl₃ (0.001), Glucosa (10), NH₄Cl (1), KH₂PO₄ (0.075), peptona (1) y E.L (5) - pH 7.2 (controlado) 	<ul style="list-style-type: none"> - Preinóculo: 37 °C a 130 rpm durante 48 h en matraz - Biorreactor de 1.2 L. Cultivo por Lote - Medio de crecimiento y producción (g/L): MgCl₂·6H₂O (13), CaCl₂·2H₂O (0.69), KCl (4), MgSO₄·7H₂O (20), Fe²⁺ (0.010), KH₂PO₄ (0.4), NaHCO₃ (0.25), NaBr (0.5), Glucosa (10) - pH 7.5±0.3 - 40 °C durante 72 h - Salinidad (NaCl [g/L]): 75, 150, 200 y 250 - Relación C/N: 5, 15, 35 y 65 	<ul style="list-style-type: none"> - Preinóculo: 37 °C a 130 rpm durante 48 h en matraz bafleado - Biorreactor de 10 L en medio <u>no estéril</u>. Cultivo por Lote alimentado - Medio de crecimiento y producción (g/L): MgCl₂·6H₂O (13), CaCl₂·2H₂O (0.69), KCl (4), citrato NH₄Fe (III) (0.063); SL6 (1.125), MgSO₄·7H₂O (20), NaHCO₃ (0.25), NaBr (0.5), E.L. (6.25), Glucosa (10). Antiespumante <i>Struktol</i>TM (10%, p/v) - pH 7.0±0.4 - 41 °C con agitación ~300–650 rpm durante 62 h - Salinidad (NaCl [g/L]): 150
Rendimiento Y_{EPS}^t (g/L)	0.206 ^{168 h}	3 ^{48 h}	3 ^{62 h}	C/N=5 0.733 ^{60 h} NaCl de 75 g/L *0.371 ^{48 h}
Caracterización fisicoquímica del EPS	Producción de dos EPS Composición monomérica: Glc, GlcN, AGlc, Gal, GalN Carbohidratos totales: 91% (p/p) Ácidos urónicos: 12.5% (p/p) Proteína: 1.4 % (p/p) Masa molar EPS 1: M _w : 206 kDa EPS 2: M _w : 801.7kDa	Composición monomérica: Man, Glc, Gal, ANI Ácidos urónicos: 2.28% Proteínas: 7.50% Sulfatos: 6-6.8 %	Composición monomérica: Man, Glc, Gal y GlcNAcA Carbohidratos totales: 55.75% p/p Ácidos urónicos: 0.7–2.28% p/p Proteína: 7.50–15% p/p Masa molar: M _w : >1000 kDa	NR
Propiedades del EPS	<ul style="list-style-type: none"> - Actividad emulsificante (0.5%, p/v) con compuestos hidrófobos: Aceite de girasol y oliva, mineral, <i>n</i>-Hexano, Tolueno y Xileno. -Actividad Antioxidante (10 mg/mL) ensayos DPPH, TAC y FRAP 	Modificador de viscosidad (0-2%, p/v)	Modificador de viscosidad	NR
Referencias	(Squillaci et al., 2016)	(Antón, Meseguer, & Rodriguez-Valera, 1988)	(Koller, 2015)	(Cui, Gong, Shi, & Wang, 2017; Cui, Shi, & Gong, 2017)

Continuación de la Tabla 2-3

Microorganismo Halófilo	<i>Halorubrum</i> sp. (TBZ112)	<i>Haloferax mucosum</i> (DSM 27191)	<i>Haloarcula hispánica</i> (ATCC33960)	<i>Haloarcula hispánica</i> (ATCC33960)
Fuente de carbono y nitrógeno	Glucosa Peptona Extracto de levadura	Glucosa Extracto de Levadura Tryptona	Extracto de levadura Casaminoácidos	Extracto de levadura Casaminoácidos
Condiciones de cultivo	<ul style="list-style-type: none"> - Matraz agitado - Medio de crecimiento y producción (g/L): MgCl₂·6H₂O (5.9), MgSO₄·7H₂O (5.9), CaCl₂·2H₂O (1.8), KCl (0.55), NaHCO₃ (0.16), KBr (0.08), SrCl₂ (0.034), H₃BO₃ (0.022), Na₂O₃Si (0.004); NaF (0.0024); NH₄ NO₃ (0.0016); Na₂HPO₄ (0.008); peptona (5) y E.L. (1) y glucosa (10) - 32 °C, 150 rpm - pH 8 - Salinidad (NaCl [g/L]): 200 	<ul style="list-style-type: none"> - Matraz agitado - Preinóculo 37 °C, 250 rpm durante 72 h - Medio de producción: ATCC 2185 (g/L): Tryptona (5), E.L. (6), Glucosa (2), MgSO₄·7H₂O (20), citrato de sodio (3), KCl (2) - 37 °C, 250 rpm durante 96 h - pH 7.5 - Salinidad (NaCl [g/L]): 120 	<ul style="list-style-type: none"> - Matraz agitado - Medio de cultivo: Medio AS-168 (g/L): casaminoácidos (5.0); E.L. (5.0); glutamato de sodio (1.0); citrato de sodio (3.0); KCl (2.0); MgSO₄·7H₂O (20); FeSO₄·4H₂O (0.050); MnCl₂·4H₂O (0.00036); NaCl (200) y pH: 7 - Salinidad (NaCl [g/L]): 200 - 37°C a 200 rpm durante 300 h 	<ul style="list-style-type: none"> - Matraz agitado orbitalmente - Medio de cultivo: Medio AS-168 (g/L): casaminoácidos (5.0); E.L. (5.0); glutamato de sodio (1.0); citrato de sodio (3.0); KCl (2.0); MgSO₄·7H₂O (20); FeSO₄·4H₂O (0.050); MnCl₂·4H₂O (0.00036); NaCl (200) y pH: 7 - 37°C a 200 rpm durante 300 h
Rendimiento Y _{EPS} ^t (g/L)	0.48 ²¹⁶ h	7.15 ⁹⁶ h	0.030 ²⁰⁰ h	NR
Caracterización fisicoquímica del EPS producido	<p>Composición monomérica (% mol): Man (19.95), GlcN (15.55), GalA (15.43), Ara (12.24), GlcA (12.05), Xil (7.51), Gal (6.53), Glc (6.01), Rib (2.75), Ram (1.80)</p> <p>Carbohidratos totales: 70% (p/p)</p> <p>Ácidos urónicos: 8.3% (p/p)</p> <p>Proteína: 0.8% (p/p)</p> <p>Masa molar M_n: 3.46 kDa M_w: 5.052 kDa PDI (M_w/ M_n): 1.45</p>	<p>Carbohidratos totales: 76.60% (p/p)</p> <p>Proteínas: 10% (p/p)</p> <p>Ácidos urónicos: 2.02% (p/p)</p> <p>Masa molar M_n: 76.38 kDa M_w: 152 kDa PDI (M_w/ M_n): 1.99</p>	<p>Monosacáridos: Man, Gal y Glc (relación molar 55.9:43.2: 0.9)</p> <p>Carbohidratos totales: 51% (p/p)</p> <p>Sulfatos: 26% (p/p)</p> <p>Masa molar M_w: 1100 kDa</p>	<p>EPS 1: WT</p> <p>Monosacáridos: GlcA:Man:Glc:Gal (4.3:3.9:1.6:1)</p> <p>Masa molar M_w: 2.126 × 10⁷ Da</p> <p>EPS 2: ΔHAH₁₂₀₆</p> <p>Monosacáridos: GlcA:Man:Glc:Gal (0.8:3:1.6:1)</p> <p>Masa molar M_w: 2.126 × 10⁷ Da</p>
Propiedades del EPS	No induce citotoxicidad sobre líneas celulares de fibroblastos dérmicos (HDF) Actividad antiproliferativa contra el cáncer gástrico humano (MKN-45)	Emulsificante (0.32%, p/v) de compuestos hidrófobos: aceite mineral, aceite de ricino, hexano, queroseno, cloroformo. Modificador de viscosidad	NR	Actividad antiviral vs SARS-CoV-2 Actividad anti-infección (65%) de células Vero 6 (células epiteliales del riñón de un mono verde africano) utilizando una dosis de 11.1 μg/mL
Referencias	(Hamidi et al., 2019)	(López-Ortega et al., 2020)	(Lu et al., 2017)	(Xu et al., 2022)

Abreviaturas: Y_{EPS}: rendimiento de exopolisacárido; E.L. extracto de levadura; MCS: masa de células secas; man: manosa; Ara: arabinosa; Gal: galactosa; Fru: fructosa; Fuc: fucosa; Man: manosa; Rib: ribosa; Ram: ramnosa; Qui: quinovosa; Xyl: xilosa; AGlc: ácido glucurónico; AGal: ácido galacturónico; GalNAc: N-acetil-galactosamina; GlcNAc: N-acetil-glucosamina; GlcNAcA: 2-acetamido-2-ácido desoxiglucurónico; QuiNAc: N-acetil quinovosamina; GlcN: Glucosamina; GalN: galactosamina.
ANI: azúcar no identificado; M_n: Peso molecular promedio numérico; M_w: Peso molecular promedio en peso; T_g: temperatura de transición vítrea; T_m: temperatura de fusión; NR: no reportado; ^t: tiempo de máxima producción. [~]Y reportado en g_{EPS}/g_{biomasa}; IC₅₀: Concentración inhibitoria del 50% del radical libre DPPH.

2.2.4 *Haloferax mucosum*

Haloferax mucosum fue aislada, secuenciada y reportada por primera vez por el grupo de [Allen et al. \(2008\)](#); esta arquea halófila fue colectada en 2004 en Hamelin Pool, Shark Bay, Australia. Dentro de la descripción se encuentra que son células pleomórficas, no móviles, Gram-negativas. En medio sólido forma colonias celulares mucoides de 3 – 5 mm de diámetro y tienen un color rojo – rosa ([Dussault, 1955](#)). En la [Figura 2-5](#), se puede apreciar un cultivo del *Haloferax mucosum* en medio ATCC 2185 (C/N 35, NaCl 2.5 M).

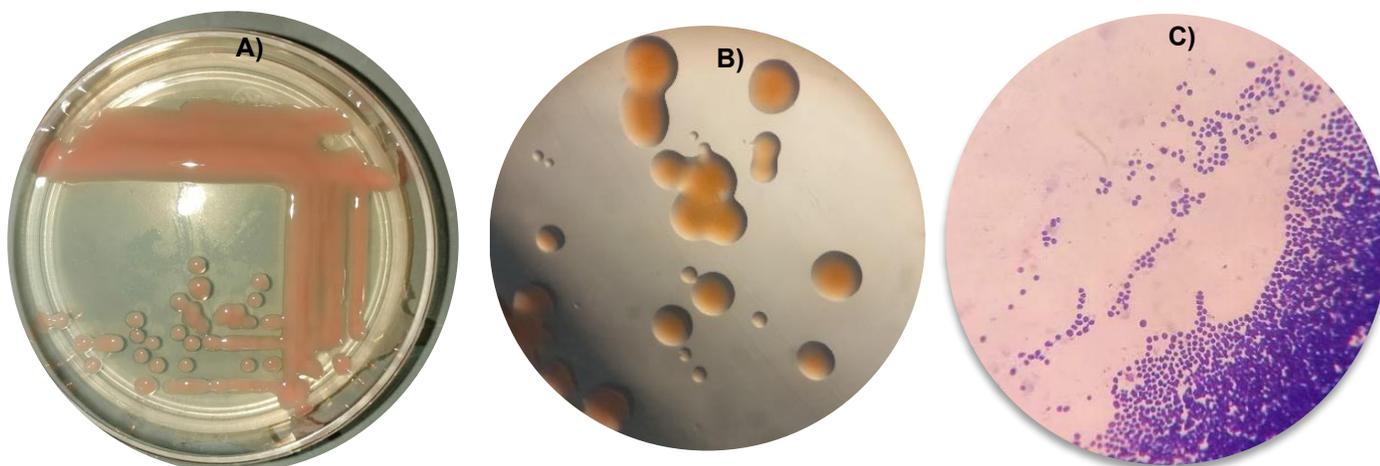


Figura 2-5. Fotografías de la arquea halófila *Haloferax mucosum*, crecida en medio sólido ATCC 2185, 2.5 M NaCl suplementado con glucosa e incubada a 37 °C, después de 48 h de crecimiento. A) Crecimiento de colonia mucoide; B) Vista de colonia mucoide con aumento 1000×; C) Células de *Haloferax mucosum* en tinción para halófilos (Fotografías tomadas por: Marianela Escalante Avilés).

Esta arquea halófila extrema es capaz de crecer en un rango de 1.7 – 5.1 M de NaCl, aunque las concentraciones óptimas son de 2.6 a 3.4 M; puede crecer en medios con pH entre 6.0 - 10.0 y temperaturas desde 23 hasta 55 °C, sin embargo, las condiciones de pH y temperatura que favorecen el crecimiento óptimo de esta haloarquea son de 7.4 y 42 hasta 53 °C, respectivamente.

Esta arquea halófila extrema es capaz de producir EPS en condiciones de estrés, cuya composición química y propiedades tecno-funcionales son de interés biotecnológico ([ver Tabla 2-3](#)).

Recientemente, [López-Ortega et al \(2020\)](#) reportaron la recuperación de EPS

a partir del cultivo sumergido de *Haloferax mucosum* a nivel matraz en condiciones de crecimiento de 250 rpm e incubada a 37 °C. Cuando la arquea se cultivó en medio ATCC 2185 con una relación C/N ~9, utilizando glucosa y extracto de levadura como fuentes de carbono y nitrógeno, produjo hasta 7.15 g/L de EPS a las 96 h de cultivo. Después de su purificación, el EPS fue parcialmente caracterizado, se evaluaron las propiedades reológicas de sus soluciones acuosas y la capacidad de formar emulsiones con compuestos orgánicos como queroseno, hexano, cloroformo y algunos aceites como el de ricino y aceite mineral. En efecto, el EPS de *Haloferax mucosum* en solución acuosa presentó un comportamiento pseudoplástico o reo-fluidificante (EPS- *Haloferax mucosum* 1% presentó un índice de flujo de 0.57), es decir, a medida que incrementa la velocidad de corte, la viscosidad de la solución acuosa disminuyó. Por otro lado, las emulsiones estabilizadas con este EPS fueron estables a temperaturas altas (hasta 100 °C), también en un amplio rango de pH desde 4 hasta 12 y en dispersiones fuertemente iónicas hasta un contenido de NaCl de 4 M. Las emulsiones del EPS en hexano presentaron mejor actividad de emulsión que las emulsiones estabilizadas con goma Arábica (polímero comercialmente usado para estabilizar emulsiones). Interesantemente, para estabilizar las emulsiones con la goma Arábica, la concentración tuvo que incrementarse ocho veces con respecto al EPS (0.32%, p/v), en ensayos de cizalla oscilatoria de baja amplitud, las emulsiones formuladas con solución de EPS y *n*-hexano (1:1, v/v), demostraron que el comportamiento de ambas emulsiones es similar, presentando un comportamiento viscoelástico. Esta capacidad de estabilizar emulsiones se puede atribuir al alto contenido de proteína (10%) que presentó el EPS (aún después de purificar) y a su masa molecular (152 kDa).

La acumulación del PHA en esta arquea halófila, no ha sido reportada, es por ello que con ayuda de la microscopía de contraste de fases se identificó la acumulación de este biopolímero, el cual posteriormente fue parcialmente caracterizado en cuanto a sus propiedades químicas (composición monomérica y masa molar) y térmica ([ver Capítulo 3](#)).

2.3 MATERIALES Y MÉTODOS

2.3.1 MATERIALES

2.3.1.1 *Microorganismo productor y medio de cultivo*

La cepa de la arquea halófila *Haloferax mucosum* (DSM 27191) fue obtenida de la colección alemana *German Collection of Microorganisms and cell cultures GmbH* (DSMZ, por sus siglas en alemán), revitalizada y conservada según las indicaciones de la DSMZ. La cepa se revitalizó durante 20 días en incubadora a 37 °C en medio ATCC 2185 (NaCl, 4 M) y se conservó en ultracongelación (-72°C), en crioviales de 2 mL en medio GSW descrito por [López Ortega et al. \(2020\)](#).

2.3.1.2 *Medios de cultivo*

- *Medio de conservación GSW:*

Para el medio de conservación GSW se preparó glicerol y agua sintética (SW *por sus siglas en inglés*) al 30%. El agua sintética al 30% contiene (g/L): NaCl (240), MgSO₄·7H₂O, (35), NaHCO₃, (0.2), NaBr, (0.8), MgCl₂·6H₂O (30), KCl (7), buffer Tris-HCl 1M, pH 7.5 (20 mL) y CaCl₂ 0.05 M (200 μL).

- *Medio de activación y preinóculo:*

Medio ATCC 2185 (NaCl, 4M) cuya composición en g/L es: NaCl (MEYER, J0420300), (250); MgSO₄·7H₂O (MEYER, M0522306), (20); citrato trisódico (MEYER, M1218820), (3); Triptona (Bacto™, 5124745), (5); extracto de levadura (BD Bioxon,1068823), (3); y 100 μL de solución de elementos traza (conteniendo, mg mL⁻¹; ZnSO₄·7H₂O, 6.6; MnSO₄·7H₂O, 1.7; Fe (NO₄) (SO₄)₂·6H₂O, 3.9; CuSO₄·5H₂O, 0.7).

- *Medio de producción:*

Para la exploración de síntesis de EPS y PHA el medio de cultivo ATCC 2185 se modificó ajustando extracto de levadura 6 g/L, NaCl 2.5 M, y se exploró la relación molar C/N= 35.

2.3.1.3 *Preparación del inóculo de Haloferax mucosum*

Para promover el crecimiento de *Haloferax mucosum* en medio líquido, se

inocularon 750 μL de la cepa conservada en criotubo en un matraz Erlenmeyer de 100 mL que contenía 20 mL de medio ATCC 2185 y se incubó a 37 °C durante 72 h en agitación orbital de 130 rpm.

Transcurrido el tiempo de activación (72h), 800 mL de medio de cultivo modificado (NaCl 2.5 M y C/N=35) se inoculó con *Haloferax mucosum* al 5% (v/v) y posteriormente, el volumen fue dividido en 8 matraces bafleados Erlenmeyer de 500 mL; las condiciones de fermentación se establecieron a 37 °C y 130 rpm y se realizaron en una incubadora Barnstead, MAX Q 5000. Para el muestreo se tomó un matraz de 100 mL cada 24 h concluyendo a las 96 h. Durante las cinéticas se monitoreó el crecimiento celular por peso seco y densidad óptica (λ_{600}), el consumo de azúcares (Miller, 1959) y la producción de EPS y PHA.

La tasa máxima de crecimiento celular ($\mu_{m\acute{a}x}$; h^{-1}) fue determinada mediante regresión no lineal de los datos de biomasa (x) ajustados a la ecuación logística de Gompertz de cuatro parámetros (Ecuación 1), utilizando el Software SigmaPlot 14.5 (Systat Software Inc., E.U.A.).

$$x(t) = y_0 + ae^{\left(-e^{-\left(\frac{t-x_0}{b}\right)}\right)} \quad (\text{Ec. 1})$$

$x(t)$ es la concentración de biomasa a cualquier tiempo, t (h)

x_0 , y_0 , a , y b son constantes de regresión.

El valor de $\mu_{m\acute{a}x}$ (h^{-1}) se estimó de acuerdo a la Ecuación 2:

$$\left(\left(\frac{d}{dt} x(t)\right) \times \frac{1}{x(t)}\right)_{m\acute{a}x} \quad (\text{Ec. 2})$$

La velocidad específica de consumo de glucosa $r_{cm\acute{a}x}$ ($g_{sustrato} \text{h}^{-1} g^{-1} x$) fue estimada mediante la regresión no lineal de los datos de carbono (c) ajustados a la ecuación logística Sigmoidal de tres parámetros (Ecuación 3), utilizando el Software SigmaPlot 14.5 (Systat Software Inc., E.U.A.).

$$c(t) = \frac{a}{\left(1 + e^{\left(\frac{-(t - c_0)}{b}\right)}\right)} \quad (\text{Ec. 3})$$

$c(t)$ es la concentración de carbono a cualquier tiempo, t (h)
 c_0 , a , y b son constantes de regresión.

El valor de $r_{cm\acute{a}x} g_{sustrato} h^{-1} g^{-1} x$ se estimó de acuerdo a la [Ecuación 4](#):

$$\left(-\left(\frac{d}{dt} c(t)\right) \times \frac{1}{x(t)}\right)_{m\acute{a}x} \quad (\text{Ec. 4})$$

2.3.2 PRODUCCIÓN Y RECUPERACIÓN DEL EPS E IDENTIFICACIÓN DE LA ACUMULACIÓN DEL PHA

2.3.2.1 Producción del EPS

El medio de cultivo ATCC 2185 modificado (C/N=35, extracto de levadura 6 g/L y NaCl 2.5 M), adicionado con glucosa como fuente de carbono, fue seleccionado como el medio de cultivo adecuado para la coproducción de EPS y acumulación de PHA. Primero, *Haloferax mucosum* fue inoculada al 5% (v/v) en el medio ATCC 2185 modificado con un cultivo iniciador de 72 h de crecimiento. Las condiciones de crecimiento se establecieron a una temperatura de incubación de 37 °C y una agitación orbital de 130 rpm. Cuando el cultivo alcanzó las 96 h la fermentación se detuvo y el EPS fue recuperado y purificado como se indica a continuación.

2.3.2.2 Recuperación del EPS

Para la recuperación y cuantificación de EPS, el caldo fermentado fue centrifugado a 6000 rpm, 4 °C por 60 min en una centrífuga refrigerada HERMLE, Z323K. El sobrenadante fue recuperado y se precipitó cuidadosamente con etanol frío (-14 °C), la solución etanólica (sobrenadante-etanol) se mantuvo en condiciones estáticas en cámara fría (4 °C) durante 12 h. Los sólidos insolubles en etanol fueron

recuperados por filtración empleando tela organza y deshidratados con etanol absoluto. El excedente de etanol se evaporó en horno de convección (Shel-Lab, Modelo 1380FX) a 40 °C y secado hasta peso constante. En la [Figura 2.6](#) se esquematiza los pasos de recuperación del EPS.

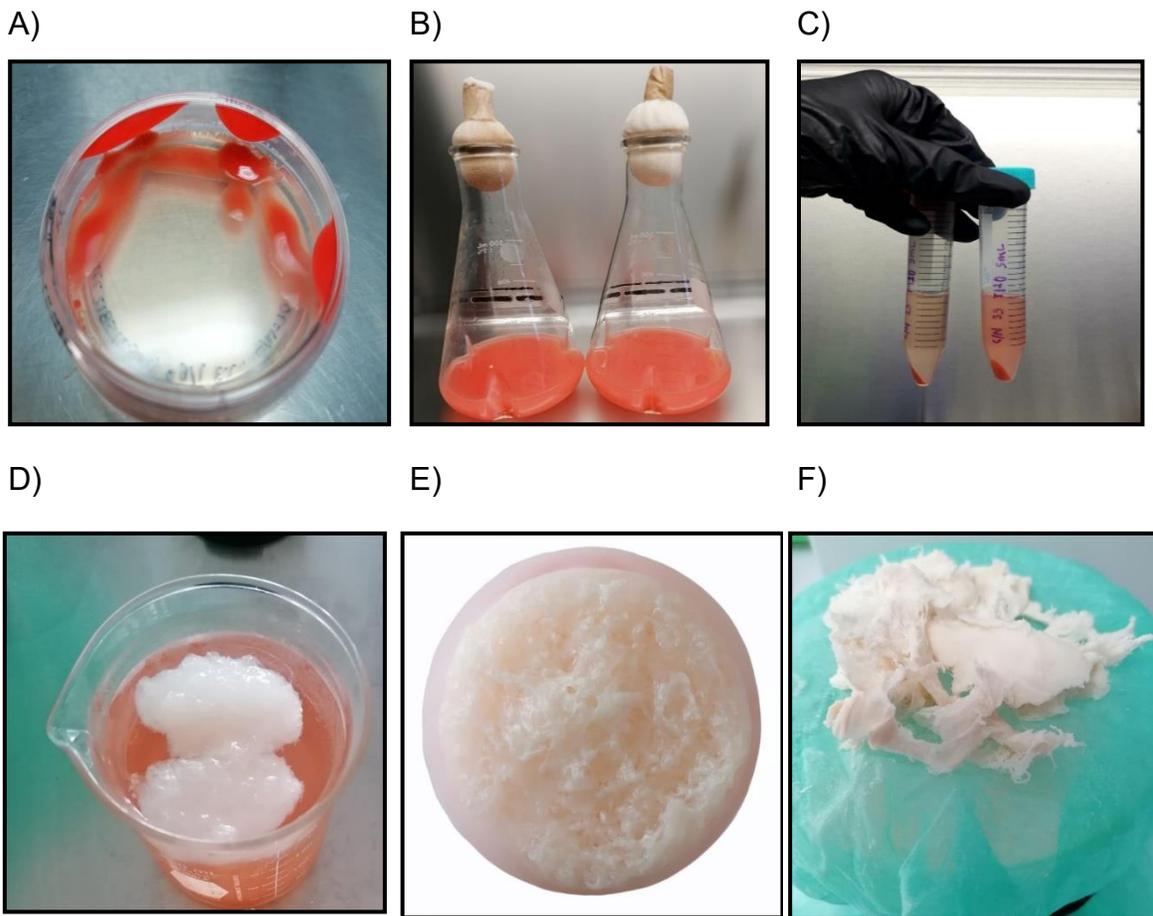


Figura 2-6. Fotografías representativas del proceso de producción y recuperación de EPS. A) *Haloferax mucosum* creciendo en medio sólido ATCC 2185 (NaCl, 4M); B) Crecimiento de EPS en matraz bafleado de 500 mL; C) Biomasa y sobrenadante separados por centrifugación; D) y E) Sólidos insolubles en etanol; F) Deshidratación de sólidos insolubles con etanol absoluto.

2.3.2.2.3 Purificación del EPS

El polisacárido (EPS) crudo y seco fue pulverizado en un mortero y resuspendido en H₂O destilada (1.5%, p/v) y dializado contra agua destilada en membrana de celulosa con tamaño de corte de 10-12 kDa, durante 72 h (reemplazando el agua dos veces al día hasta una conductividad de $5.43 \pm 0.2 \mu\text{S cm}^{-1}$). Después de la diálisis, la solución polimérica fue concentrada hasta 10 veces en un rotavapor (Büchi Rotavapor R-215) a 40 °C, 79 mbar. La solución concentrada se precipitó con etanol frío absoluto y se almacenó a -14 °C toda la noche. El EPS dializado se recuperó por centrifugación (8,500 ×g, 30 min a 4 °C) y el concentrado, fue secado en horno de convección hasta peso constante. Finalmente, el EPS purificado se pesó en una balanza analítica (Sartorius, Modelo MSE 2.7) y se almacenó para su posterior caracterización.

2.3.2.4 Detección de la acumulación de gránulos de PHA usando microscopía de contraste de fases

La acumulación intracelular del PHA se evidenció por microscopía de contraste de fases durante la cinética de crecimiento de *Haloferax mucosum* (96 h), usando un Microscopio Nikon Eclipse Ci, acoplado con Lámpara UV y contraste de fases, utilizando rojo Nilo como fluoróforo y observadas con un aumento de 400× (Shruti, Pérez-Guevara, Roy, & Kutralam-Muniasamy, 2022).

2.3.2.5 Recuperación del PHA

La recuperación del PHA se realizó de acuerdo con el método descrito por Koller et al., (2015) con ligeras modificaciones. Las células fueron separadas del caldo de fermentación por centrifugación (6,000 rpm, 60 min, 4 °C). La biomasa fue recuperada, resuspendida en solución salina 0.8 M y centrifugada a 6,000 rpm a 4 °C durante 20 min y el sobrenadante fue descartado, este paso de lavado fue repetido dos veces. Después, la biomasa se secó a 70 °C en un horno de convección Shel-Lab (Modelo 1380FX) para determinar su peso seco. Posteriormente, la biomasa se pulverizó en un mortero y fue resuspendida en etanol

(15 mL/g_{biomasa seca}) manteniéndola en agitación magnética 24 h. La suspensión etanólica de biomasa, libre de pigmentos y lípidos, fue filtrada a través de una membrana de celulosa (0.45 μm) utilizando una bomba de vacío y un matraz kitasato, el etanol residual se evaporó a 70 °C en un horno de convección hasta que la biomasa quedó a peso constante. Después, las células secas se suspendieron en cloroformo (35 mL/g_{biomasa seca}) durante 20 h en agitación magnética, seguido de esto, la muestra se calentó hasta 135 °C reduciendo su volumen hasta un 5% del volumen inicial. Para recuperar el PHA soluble en cloroformo se filtró la biomasa con una bomba de vacío (el proceso se repitió dos veces); finalmente la mezcla solvente-PHA se colocó en vasos de precipitados de vidrio (10 mL) y el solvente fue evaporado a 85 °C, el pellet de PHA adherido a las paredes del contenedor se recuperó adicionando etanol frío, el etanol residual fue eliminado por evaporación y se determinó el peso del PHA en forma de película. Las muestras de PHA se resguardaron para su caracterización fisicoquímica (*ver Capítulo 3*).

La acumulación de PHA ($PHA_{acumulación}$) fue determinada con la [Ecuación \(5\)](#), donde $m_{PHA\ seco}$ es la masa del PHA seco recuperado en cualquier tiempo de fermentación y X es la masa de células secas en cada tiempo de muestreo.

$$PHA_{acumulación} = \frac{m_{PHA\ seco}}{X} \times 100 \quad \text{Ec. (5)}$$

2.3.3 ANÁLISIS FISICOQUÍMICO DEL EXOPOLISACÁRIDOS (EPS) PRODUCIDO POR *Haloferax mucosum*

2.3.3.1 Composición química del EPS

a) Determinación del contenido de azúcares totales

El contenido de carbohidratos totales se determinó por el método colorimétrico de fenol- sulfúrico descrito por [Dubois et al., \(1956\)](#). En un tubo de vidrio roscado se agregan 0.5 mL de muestra de EPS (0.5 mg/mL), posteriormente se agregaron 0.5 mL de solución de fenol (5%, p/v) y finalmente se adicionaron lentamente 2.5 mL de H₂SO₄. Los tubos se sellaron herméticamente con Parafilm y se colocaron

en baño de agua en ebullición (~96 °C) durante 15 min. La reacción se detuvo al sumergir los tubos en baño con hielo. Con ayuda de un vórtex, la solución fue homogenizada y la reacción se leyó a $\lambda = 490 \text{ nm}$. Para cuantificar el contenido de azúcares totales presentes en la muestra, se preparó previamente una curva de calibración de 0 a 0.1 g/L de glucosa.

b) Determinación del contenido de proteína

La estimación indirecta del contenido de proteína en EPS purificado fue realizada por el método colorimétrico de [Bradford \(1976\)](#). Para la curva de calibración, se siguieron las indicaciones del manual “Quick Start™ Bradford Proteínas Assay (BIO-RAD)”. Brevemente, para estimar el contenido de proteína se preparó una curva estándar de proteína albúmina bovina (SAB) hasta 2 mg/mL. En un tubo cónico se agregaron 20 μL de muestra de EPS (5 mg/mL) y/o SAB, y posteriormente, se agregó 1 mL de reactivo de Bradford (Bio-Rad), la mezcla se homogeneizó y se dejó en reposo 2 min. La mezcla se vertió en una celda de vidrio y la absorbancia fue medida a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro Genesys 10S UV-Vis (ThermoScientific). Cada determinación se realizó por triplicado.

c) Determinación de contenido de grupos sulfatados

Para la determinación del contenido de grupos sulfatos, se utilizó el método turbidimétrico de BaCl_2 – gelatina descrita por [Dodgson \(1962\)](#). Este método se fundamenta en que el ion sulfato (SO_4^{2-}) contenido en las muestras, reacciona con el ion de Ba^{2+} para formar sulfato de Bario (BaSO_4), un precipitado insoluble en agua a pH ácido. La turbidez se genera por el precipitado de la gelatina.

Preparación de muestra hidrolizada:

Se pesaron 5 mg de EPS, a los cuales se les agregó 250 μL de HCl a 0.5 N, el EPS se incubó a 105 °C por 5 h en un horno de convección Shel-Lab (1380FX). Posterior al tiempo de incubación, se enfrió a temperatura ambiente y se centrifugó a 13,500 rpm por 15 min recuperando el sobrenadante.

Preparación de muestra no hidrolizada:

Se pesó 5 mg de EPS, al cual se le agregó 250 μL de agua desionizada y se centrifugó a 13,500 rpm durante 15 min.

En un microtubo Eppendorf cónico de 1.5 mL se homogenizaron 140 μL de HCl (0.5 N) y 20 μL de muestra de EPS (5 mg/mL) hidrolizada (HCl, 0.5 N). Inicialmente la mezcla de reacción se midió a una longitud de onda de 405 nm; después se adicionaron 40 μL de reactivo de BaCl_2 -gelatina. El contenido se mezcló con vórtex y se incubó durante 20 min a 70 °C. Después de transcurrido el tiempo, nuevamente se midió la absorbancia a 405 nm. Las determinaciones fueron realizadas por triplicado. La estimación del contenido de grupos sulfatos se realizó mediante una curva de calibración de 0 a 0.2 mg/mL de Na_2SO_4 en HCl (0.5 N). Una solución del polisacárido ι -Carragenina (Sigma-Aldrich) a una concentración de 5 mg/mL, fue utilizada como control positivo debido a su alto contenido de grupos sulfatados reportados en la literatura.

d) Determinación del contenido de monosacáridos

La identificación y cuantificación de monosacáridos presentes en el EPS purificado se realizó mediante cromatografía líquida de alta eficiencia usando un equipo HPLC Agilent 1260 Infinity HPLC (Agilent Technologies Inc. E.U.A.) acoplado a un detector de índice de refracción (RID) usando una columna BioRad Aminex HPX 87P (7.8 \times 300 mm), como fase móvil se utilizó agua filtrada del Barnstead Micropure UV, posteriormente esta misma se filtró por vacío en equipo de Kitasato con membranas de Nylon Agilent® (0.45 μm). El flujo de la fase móvil se mantuvo a 0.6 mL/min, la temperatura de la columna y del detector fue de 85 °C y 50°C, respectivamente.

Para la preparación de la muestra de EPS, una masa de 3 mg de EPS fue pesada en un tubo de vidrio y sometida a hidrólisis ácida usando ácido trifluoroacético (TFA) 2 M; la mezcla fue calentada en una temperatura sostenida de 121 °C durante 5 h en una autoclave automática Tuttnauer (TermoScientific). Al

finalizar, el TFA de las muestras fue evaporado utilizando un concentrador SpeedVac Savant (SPD2010 Thermo Scientific) durante 2 h a 45 °C y 733.27 Pa. Una vez evaporado el solvente, la muestra seca fue hidratada con 2 mL de agua destilada y el pH se ajustó con NaOH (2 N) hasta obtener un pH final cercano a 7, finalmente se aforó a 10 mL con agua destilada. La muestra neutralizada se filtró a través de acrodiscos de Nylon de 0.22 μm y se colocó en viales ámbar para su posterior inyección (20 μL). Para la cuantificación de los componentes monoméricos del EPS se utilizaron diferentes estándares de monosacáridos: glucosa, manosa, arabinosa, fructosa, xilosa, ramnosa, galactosa, ácido galacturónico y ácido glucurónico (Sigma-Aldrich®) a una concentración de 0.5 g/L. Por cada estándar se corrió una curva de calibración con masas desde 0.0005 hasta 0.00175 mg.

e) Distribución de la masa molar

La masa molar (masa molecular promedio en número - M_n - y la masa molecular promedio en peso - M_w -) y el índice de polidispersidad (PDI: M_w/M_n) del EPS purificado, fueron analizadas por cromatografía de exclusión molecular (HPSEC) de acuerdo a la metodología desarrollada por [Morales-Martínez et al. \(2018\)](#).

Los experimentos se realizaron en HPLC Agilent 11260 Infinity (Agilent Technologies Inc. E.U.A.) acoplado a un detector RID, usando dos columnas GPC/SEC PL aquagel-OH (0.8 μm , 300 \times 7.5 mm) Mixed-H (Agilent Technologies) conectadas en serie. Como fase móvil se usó NaNO_3 0.2 M, NaH_2PO_4 0.01 M (pH=7.0) y para evitar el crecimiento microbiano se agregó azida de sodio al 0.02% (p/v) como agente conservador. El EPS se dispersó en la fase móvil (2 mg/mL) y después la muestra se filtró a través de membranas de nylon de 0.45 μm . El flujo de la fase móvil se mantuvo a 1 mL/min y el volumen de inyección fue de 200 μL . Para la curva de calibración se inyectaron estándares de Dextranos de 50 a 670 kDa (Sigma- Aldrich; St. Louis, MO, E.U.A.). Las muestras se procesaron por triplicado y se analizaron con el Software GPC/SEC Data Analysis (Agilent Technologies, Inc., E.U.A.).

2.3.4 ESPECTROMETRÍA INFRARROJA CON TRANSFORMADA DE FOURIER (FT – IR) DEL EPS RECUPERADO

La identificación de los grupos funcionales del EPS se llevó a cabo por ATR-FTIR utilizando un espectrómetro Agilent Cary 630 FT-IR. Los espectros se registraron en un rango de 650 a 4000 cm^{-1} . Los datos se analizaron en modo de absorbancia con un Software Resolutions Pro® y MicroLab® (Agilent Technologies Inc. E.U.A.) con un promedio de 32 escaneos a una resolución de 4.0 cm^{-1} .

2.3.5 DETERMINACIÓN DE CARGA ELÉCTRICA DEL EPS MEDIANTE EL ESTUDIO DE POTENCIAL- ζ

Para la determinación de la carga eléctrica del EPS (medición del Potencial ζ), se utilizó el equipo Zetasizer Nano (ZEN3600 de Malvern Instruments, Reino Unido).

Se preparó una solución madre del EPS purificado a una concentración del 1% en agua inyectable (estéril sin impurezas) y se dispersó por agitación magnética durante 14 h. Posteriormente, se tomaron muestras de 4 mL, a las cuales se les ajustó el pH con valores desde 2 hasta 6, usando soluciones valoradas de NaOH (2 N) o HCl (0.1 N) (JT-Baker, X11C07). Posteriormente, el volumen de cada muestra se aforó a 5 mL.

Finalmente, se procedió a leer el potencial- ζ de las muestras, para ello se emplearon celdas capilares plegadas (Malvern, DTS1070), las cuales fueron llenadas cuidadosamente con 800 μL de cada muestra, evitando la formación de burbujas y lavándolas con agua inyectable después de cada muestra. Dentro del software se establecieron los parámetros solicitados de: temperatura (25 $^{\circ}\text{C}$), el índice de refracción del dispersante (1.33), el índice de refracción de la solución acuosa del EPS fue de (1.49), el grado de absorción (0.010) y el número lecturas (3 por cada muestra analizada).

2.3.6 PROPIEDADES REOLÓGICAS DEL EPS

Propiedades de flujo

El EPS purificado se dispersó en agua destilada por agitación magnética durante 14 h, la concentración analizada de EPS fue del 1% (p/v). El análisis reológico se realizó en un reómetro ARES-G2 (TA Instruments, USA), utilizando una geometría de cono-plato de 40 mm de diámetro y ángulo de 2°. La temperatura se controló a 25 °C. Las curvas de flujo se obtuvieron en un intervalo de cizalla de 10 a 100 s⁻¹. Los datos se ajustaron y analizaron utilizando el Modelo Reológico de Ostwald-de Waele (Ley de la potencia) (Ecuación 6), usando el Software SigmaPlot 14.5 (Systat Software Inc., E.U.A.).

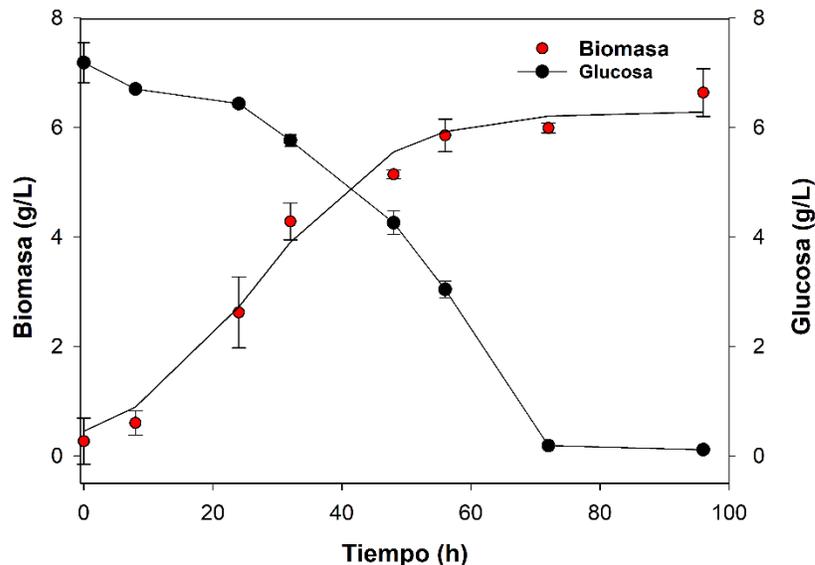
$$\sigma = K\dot{\gamma}^n \quad (\text{Ec. 6})$$

En la Ec. 6 K es el índice de consistencia (Pasⁿ), n es el índice de comportamiento al flujo (adimensional), σ es el esfuerzo de cizalla (Pa) y $\dot{\gamma}$ es el gradiente de velocidad o cizalla (s⁻¹). Cuando $n < 1$ el modelo predice un comportamiento pseudoplástico, cuando $n > 1$ describe un comportamiento dilatante y cuando $n = 1$, el modelo se reduce a la ley de Newton de la viscosidad con $\mu = K$.

2.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.4.1 COPRODUCCIÓN DE BIOPOLÍMEROS

El medio de cultivo ATCC 2185 modificado (C/N=35, NaCl 2.5 M) adicionado con glucosa fue seleccionado como mejor medio de crecimiento de *Haloferax mucosum* y producción de EPS y PHA. En la [Figura 2-7](#) podemos observar la relación entre el crecimiento celular y el consumo de glucosa obtenida de la cinética de producción de *Haloferax mucosum*, durante 96 h de fermentación, los datos presentados son el promedio de dos réplicas. En ella se puede observar que, en la fase de crecimiento exponencial, a partir de las 24 h y hasta las 72 h hubo un consumo acelerado de glucosa, la cual fue consumida al 100%; después de las 72 h es evidente que se alcanzó la fase estacionaria del crecimiento celular, lo cual es congruente, ya que la fuente de carbono es limitada para las funciones celulares básicas.



[Figura 2-7.](#) Evolución de la concentración de biomasa y glucosa, en fermentaciones de *Haloferax mucosum* en medio ATCC2185 (2.5M NaCl, C/N=35)

La máxima producción de EPS fue de 7.23 ± 0.02 g/L la cual es alcanzada cuando la arquea entra en fase estacionaria (entre las 72 y 96 h de cultivo), esta

producción de EPS es similar a lo reportado por López-Ortega et al., (2020) y es mayor a lo reportado para otras arqueas como *Haloterrigena turkmenica* (Squillaci et al., 2016), que produce 0.206 g/L de EPS, *Haloferax mediterranei* cuya producción máxima reportada ha sido de 3 g/L (Koller, 2015) y *Haloarcula* sp. M1 cuya producción máxima alcanzada fue de 3.9 g/L (Aragón-León et al. 2023). Por otro lado, la velocidad máxima específica de crecimiento celular ($\mu_{m\acute{a}x}$) fue de de 0.099 h⁻¹, esta tasa de crecimiento celular es casi tres veces mayor a lo reportado por López-Ortega et al., (2020) para *Haloferax mucosum* ($\mu_{m\acute{a}x}$ de 0.029 h⁻¹) creciendo en medio limitado con nitrógeno C/N~9 y similar a lo reportado para *Haloferax mediterranei* crecida en cultivo por lote a nivel biorreactor (volumen de trabajo de 1.2 L) en medios limitados de nitrógeno C/N 65, 35, 15 y 5, cuya $\mu_{m\acute{a}x}$ reportada fue de 0.06 h⁻¹, 0.09 h⁻¹, 0.09 h⁻¹ y 0.12 h⁻¹, respectivamente (Cui, Shi, et al., 2017).

En términos de rendimiento de EPS, éste fue de 1.32 gEPS/gBiomasa, menor a lo reportado para *Haloferax mucosum* 3.18 gEPS/gBiomasa creciendo en otras condiciones de cultivo (López-Ortega et al., 2020). Sin embargo, esto puede deberse a la desviación del flujo de la fuente de carbono hacia la producción del PHA, la cual fue del 0.05 gPHA/gBiomasa a las 96 h de fermentación. Cabe recalcar que para esta arquea no existe reporte relacionado a la producción de polihidroxicanoatos, sin embargo, comparándolo con otras arqueas halófilas que sí reportan esta producción, el valor es bajo (*Haloferax mediterranei*, 1.39 – 0.74 gPHA/gBiomasa). En la Figura 2-8, podemos observar los gráficos obtenidos de los máximos locales obtenidos de esta cinética, así como la regresión no lineal.

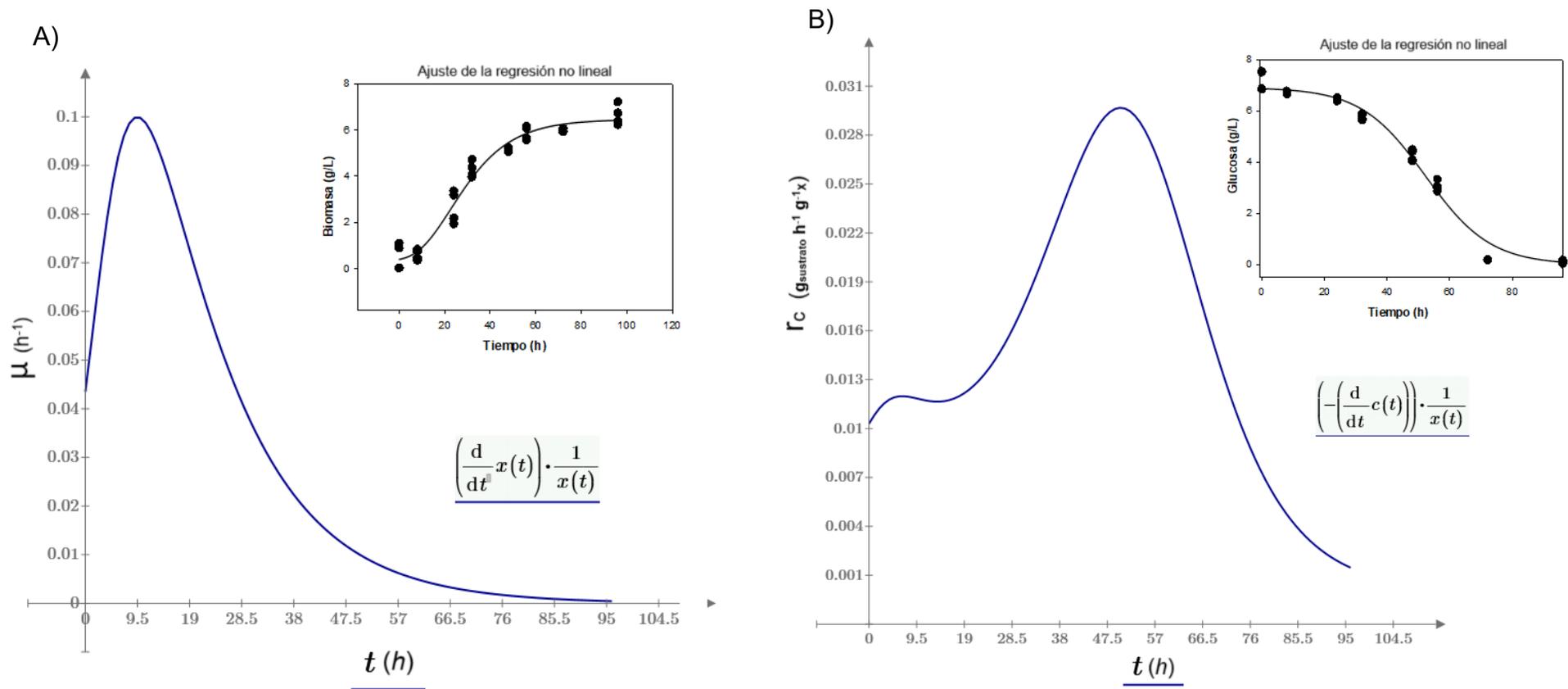


Figura 2-8. Cinética de *Haloferax mucosum* en medio ATCC 2185 (2.5 M, C/N 35). A) velocidad específica de crecimiento (μ); B) velocidad específica de consumo de glucosa (r_c).

2.4.2 MICROGRAFÍA FLUORESCENTE DE LAS CÉLULAS DE *Haloferax mucosum*.

A través de microscopía de contraste de fase fue posible observar la acumulación del polihidroxicanoato dentro las células a lo largo de las cinéticas de producción de EPS y PHA (Figura 2-9), gracias a la fotoestabilidad, afinidad y naturaleza lipófila del Rojo Nilo hacia estos polímeros (Canovas et al., 2021). De acuerdo con los resultados obtenidos se evidenció que *Haloferax mucosum* como otras arqueas halófilas, es capaz de acumular los gránulos de PHA intracelularmente.

Pese a la naturaleza del Rojo Nilo, en algunas ocasiones puede unirse a otras inclusiones lipídicas, membranas o envolturas celulares dando lugar a resultados ambiguos, aunque lo hace de forma no específica, sin embargo, la producción de este poliéster se confirmó en la extracción del bioplástico.

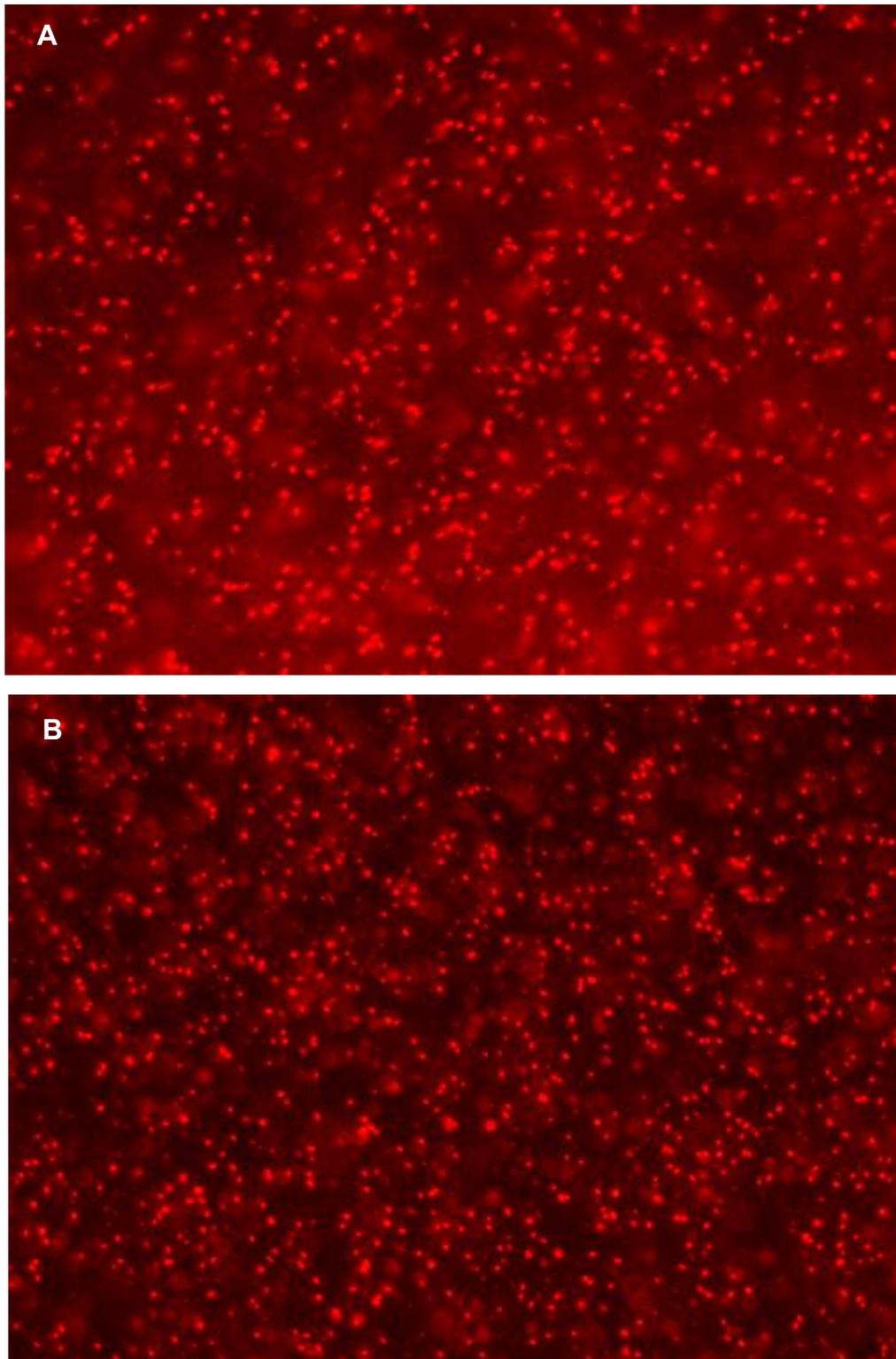


Figura 2-9. Microfotografías de fluorescencia debido a la acumulación intracelular de PHA por *Haloferax mucosum* cuando crece en medio ATCC 2185 modificado (NaCl 2 M, C/N=35) a las: A) 32 h y B) 56 h de fermentación. PHA teñido con rojo Nilo (Aumento 400×).

2.4.3 RENDIMIENTO DE PHA

La arquea halófila *Haloferax mucosum* tiene la capacidad de acumular PHA de manera simultánea a la producción de EPS, cuando la relación molar C/N en el medio de cultivo es 35 y una concentración de 2.5 M de NaCl. De acuerdo a [Cui et al. \(2017\)](#) la productividad de PHA está directamente relacionada con el crecimiento celular arqueal. La limitación de nitrógeno y el exceso de glucosa (C/N 35) resultó en un rendimiento para el PHA de 0.011 g_{PHA}/g_{biomasa}.

Tanto la presión osmótica como la limitación del contenido de nitrógeno pueden causar estrés en la célula de tal manera que la producción de ATP celular se vea afectada y la glucosa sea re-direccionada hacia la acumulación de la fuente de carbono, ya sea a través de la síntesis de EPS y/o de PHA, para evitar la lisis celular. Sin embargo, la síntesis de EPS requiere de un mayor desgaste energético, así como la biosíntesis de un mayor número de enzimas para que ésta ocurra, por tanto, el desvío del carbono hacia la acumulación de PHA puede ser la vía más corta para la célula para usar como fuente de carbono y energía. Estos resultados concuerdan con lo reportado para otras arqueas como *Haloferax mediterranei* investigado por otros autores ([Cui, Shi, et al., 2017](#); [Koller, 2015](#)).

2.4.4 CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL EPS PRODUCIDO POR *Haloferax mucosum*

2.4.4.1 Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR) del EPS haloarqueal

La identificación de los grupos funcionales dentro de la estructura del polisacárido purificado se realizó empleando espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier de reflectancia total atenuada (ATR-FTIR). El espectro infrarrojo obtenido del EPS producido por *Haloferax mucosum* (DSM 27191) muestra bandas de absorción características de los grupos funcionales típicas de los exopolisacáridos. En la [Figura 2-10](#) se observan las bandas de absorción características de la zona conocida como huella dactilar (1800 – 800 cm⁻¹) y la zona

de absorción de los grupos funcionales ($4000\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$). Las bandas de absorción que se encuentran en la región de los $3680 - 3050\text{ cm}^{-1}$ están relacionadas al estiramiento del enlace O-H de los grupos hidroxilo y una señal débil entre los 3049 y 2925 cm^{-1} indica la presencia de un estiramiento asimétrico y simétrico del enlace C-H del grupo metilo CH_3 y CH_2 respectivamente (López-Ortega et al., 2020; Spano et al., 2013). La banda encontrada en $1700\text{--}1730\text{ cm}^{-1}$ puede atribuirse al estiramiento del C=O de los carbonilos en grupos acilos. En la región de las proteínas, se encuentran una banda ancha en 1625 cm^{-1} que corresponden a estiramientos de grupos carboxilo y/o amidas ($-\text{CO}-\text{NH}_2$). En 1530 cm^{-1} se observa otra banda intensa y ancha, la cual puede atribuirse a aminas secundarias. De manera definida, se encuentra la región 1200 y 800 cm^{-1} que representa “la huella dactilar”. El pico localizado en la región de los 1260 cm^{-1} hace referencia a los grupos ésteres sulfatados (S = O) (Webber, Carvalho, Ogliari, Hayashi, & Barreto, 2012).

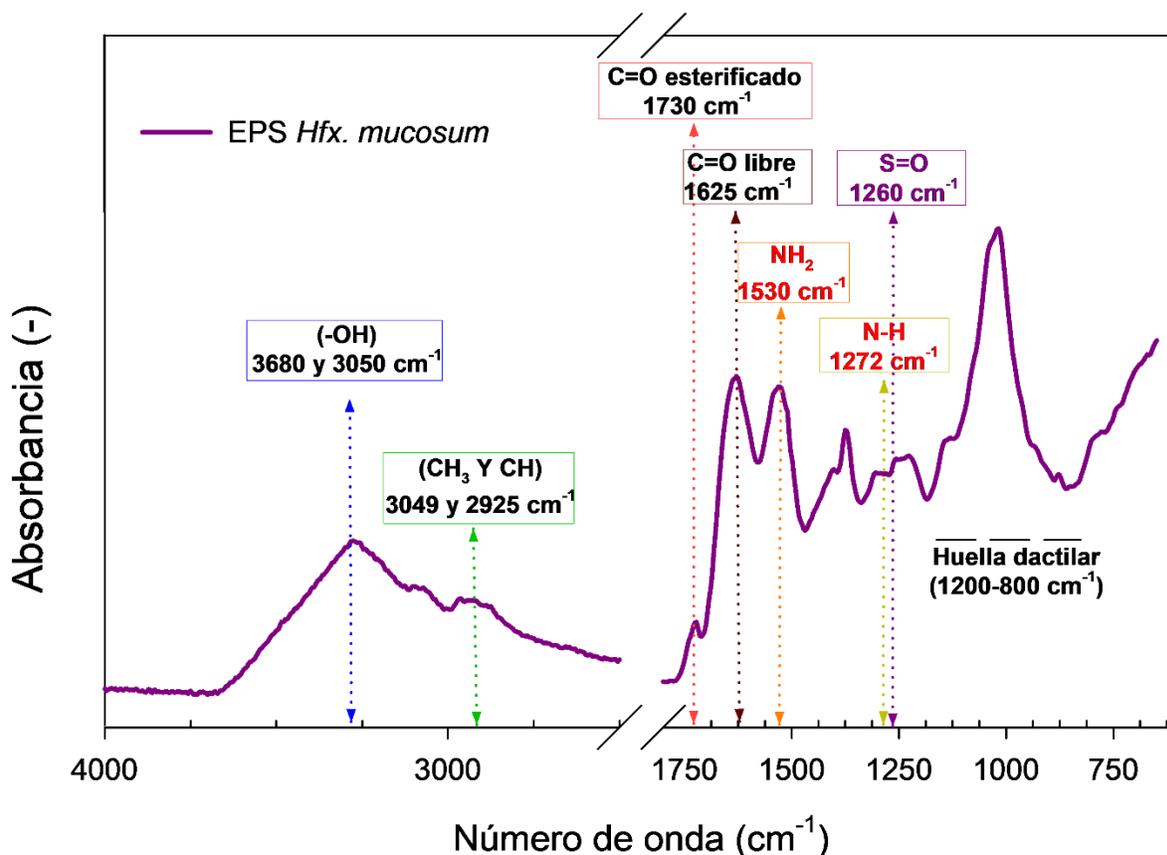


Figura 2-10. Espectroscopía FTIR obtenida del EPS producido por *Haloferax mucosum*.

2.4.4.2 Composición química

Al EPS producido, recuperado y purificado de *Haloferax mucosum*, se le realizaron diferentes pruebas para conocer su composición química básica (Tabla 2-4). El EPS tiene un contenido de carbohidratos y proteínas del 85.23 y 13.99% (p/p), respectivamente. Estos resultados difieren a los reportando por López-Ortega et al., 2020, las disimilitudes en los contenidos pueden deberse a las diferentes condiciones de cultivo en las que la arquea creció. Lu, et al., (2017) reportaron un contenido de carbohidratos totales del 51% en el EPS producido por *Haloarcula hispanica*, además reportaron la presencia de grupos sulfatados en su estructura con un porcentaje del 26% (p/p) el cual es mayor que el contenido de grupos sulfatados para el EPS de *Haloferax mucosum* (0.63%, p/p); el EPS producido por *Halorubrum* sp. TBZ112 exhibió un porcentaje alto de carbohidratos totales (70%) y

un bajo porcentaje en el contenido de proteínas (0.8%) (Hamidi et al., 2019). El contenido de carbohidratos, sulfato y proteína para *Haloterrigena turkmenica* fueron del 91%, 2.8% y 1.4%, (p/v) respectivamente (Squillaci et al., 2016).

Estudios *in vitro* han demostrado que los grupos sulfatados presentes en los polisacáridos están asociados con el potencial bioactivo del mismo. Entre ellos se encuentran los efectos anticoagulantes, antiproliferativo, antiangiogénico, antitumoral, anticancerígeno, entre otros (Haroun-Bouhedja, Ellouali, Siquin, & Boisson-Vidal, 2000; Koyanagi, Tanigawa, Nakagawa, Soeda, & Shimeno, 2003; Poli, Anzelmo, & Nicolaus, 2010).

Tabla 2-4. Composición química del EPS producido por *Haloferax mucosum* cuando crece en matraz agitado orbitalmente y en medio ATCC 2185 modificado (NaCl 2.5 M, N/C=35).

Carbohidratos	Proteínas	Grupos sulfato
totales	(% masa)	(% masa)
(% masa)		
85.23 ± 0.04	13.99 ± 0.08	0.63 ± 0.03

2.4.4.3 Composición monosacárida

La composición monomérica del EPS purificado fue determinada por HPLC. En la Figura 2-11 se muestra el cromatograma de una mezcla de estándares de monosacáridos y el perfil cromatográfico de los monosacáridos presentes en el EPS purificado, el cual está compuesto por glucosa (36.19 %, p/p), galactosa (18.24 %, p/p) y un tercer monosacárido no identificado que eluyó entre el estándar de ramnosa y manosa, mientras que en la Tabla 2-5 podemos observar las comparaciones entre los monosacáridos identificados del EPS de *Haloferax mucosum* y otras arqueas halófilas.

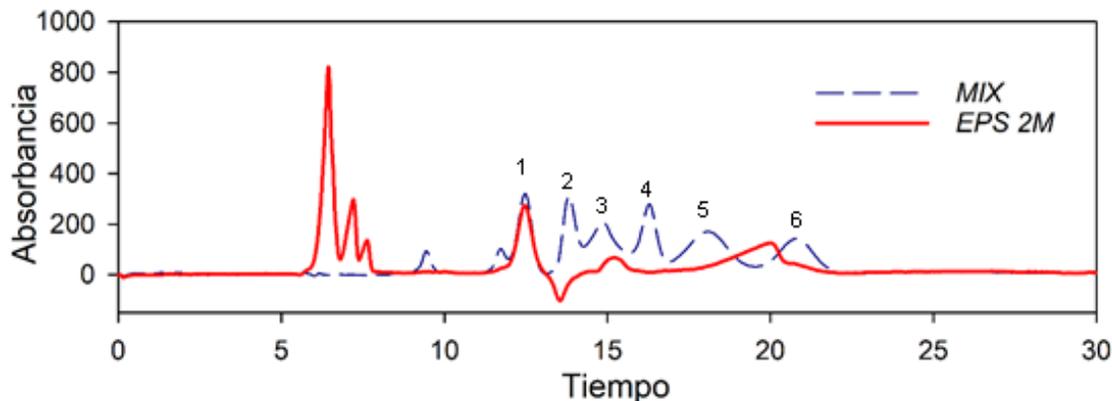


Figura 2-11. Perfil de elución del: estándar de monosacáridos (MIX) (1: glucosa; 2: xilosa; 3: galactosa; 4: arabinosa; 5: ramnosa; 6: manosa); EPS 2M, monosacáridos constituyentes del EPS purificado después de hidrólisis ácida.

Tabla 2-5. Composición monomérica (relación molar) del EPS producido por *Haloferax mucosum* y otras arqueas.

<i>Haloarquea</i>	Composición monosacárida del EPS (relación molar)	Referencia
<i>Haloferax mucosum</i>	Glc: Gal = 2 : 1	Presente estudio
<i>Haloferax mediterranei</i> ATCC 33500	Man : 2-amino-2-deoxy-GlcA = 1.0 : 1.1	(Parolis et al., 1996)
<i>Haloferax gibbonsii</i> ATCC 33959	Man : Glc : Gal : Rha = 2 : 1 : 3 : 1	(Paramonov et al., 1998)
<i>Haloterrigena turkmenica</i>	Glc : GlcNH ₂ : GlcA : Gal : GalNH ₂ = 1 : 0.65 : 0.24 : 0.22 : 0.02	(Squillaci et al., 2016)
<i>Haloarcula</i> spp. T5	Man : Gal : GlcA = 2 : 1 : 3	(Nicolaus et al., 1999)
<i>Haloarcula</i> spp. T6 and T7	Man : Gal : Glc = 1 : 0.2 : 0.2	(Nicolaus et al., 1999)
<i>Haloarcula hispanica</i> ATCC33960	Man : Gal : Glc = 1 : 0.77 : 0.02	(Y. Lu et al., 2017)

2.4.4.4 Masa molar del EPS producido por *Haloferax mucosum*

En la [Tabla 2-6](#) se presentan los datos obtenidos de la masa molecular promedio en peso (M_w), la masa molecular promedio en número (M_n) y el índice de polidispersidad ($PD=M_w/M_n$) del polisacárido producido por *Haloferax mucosum*.

El EPS exhibió una masa molar estimada de 901.29 kDa cuando la arquea creció en concentraciones salinas de 2.5 M y C/N=35, mientras que el valor del índice de polidispersidad fue de 3.34, un valor típico en polisacáridos naturales el cual revela el grado de heterogeneidad de las longitudes de cadena del polímero. Sin embargo, en diferentes condiciones de cultivo fue reportado que exhibía una masa molar de 152 kDa ([López-Ortega et al., 2020](#)) cuando creció en medio que contenía NaCl 2.1 M y C/N~9, en fermentaciones a nivel matraz agitado (250 rpm). La masa molar reportada para el EPS producido por la arquea halófila *Haloferax mediterranei* fue mayor de 1000 kDa ([Koller, 2015](#)) y para el EPS de *Haloarcula hispanica* se reportó una masa molar de 1100 kDa ([Y. Lu et al., 2017](#)); las masas molares de los EPS producidos por *Haloterrigena turkmenica* de acuerdo a [Squillaci et al., \(2016\)](#) fueron de EPS₁: 206 kDa y EPS₂: 801.7 kDa.

Tabla 2-6. Masa molecular promedio del exopolisacárido producido por *Haloferax mucosum*, dializado, clarificado y purificado, determinado por HPLC-SEC.

M_w (kDa)	M_n (kDa)	PD
901.129	269.450	3.34433

La masa molecular, la estructura química y la composición del polisacárido, son responsables, principalmente del comportamiento del EPS en soluciones acuosas. Estas propiedades están relacionadas con las características moleculares del biopolímero, como son la viscosidad intrínseca (volumen hidrodinámico de una sola molécula), la conformación y la flexibilidad molecular, las interacciones intra e intermoleculares y la naturaleza de mismo polímero ([Flores-Huicochea, Rodríguez-](#)

Hernández, Espinosa-Solares, & Tecante, 2013; Rodríguez-Hernández, Durand, Garnier, Tecante, & Doublier, 2003).

2.4.5 POTENCIAL- ζ

Este parámetro es una medida de la magnitud de la atracción o repulsión electrostática entre partículas suspendidas y permite predecir la estabilidad electrostática de una suspensión o sistema disperso. Para poder considerar una suspensión como “estable” todas sus partículas deben tener un alto grado de repulsión entre sí, o sea, valores de $P-\zeta \geq + / - 25$ mV (Cano-Sarmiento et al., 2018; Instruments, 2013).

En particular, el potencial zeta del EPS nos permite confirmar la característica polielectrolítica de esta macromolécula. El pH del EPS disuelto en agua es de 4.5. Como se puede observar en la [Figura 2-12](#), el EPS mantuvo su carga negativa, aunque con diferentes valores, en todos los pH utilizados (2 – 6), lo cual indica la naturaleza aniónica fuerte de este polímero. [Donot et al. \(2012\)](#) hacen referencia a que esta carga aniónica se encuentra en la capa superior del exopolisacárido el cual ayuda a la célula a capturar cationes y nutrientes necesarios para la célula en un momento de estrés y esto confiere al exopolisacárido la capacidad de quelar metales e iones.

La carga negativa del polisacárido puede deberse a los grupos sulfato, carboxilo o fosfato presente en su estructura ([Tabla 2-5](#)) ([Guo, Hu, Wang, & Ai, 2017](#); [Llamas, Amjres, Mata, Quesada, & Béjar, 2012](#); [Nicolaus et al., 2010](#)). [Joulak et al. \(2020\)](#) hacen mención que los grupos cargados mejoran la solubilidad del EPS, mejorando su afinidad molecular con el agua, previniendo así la asociación intermolecular.

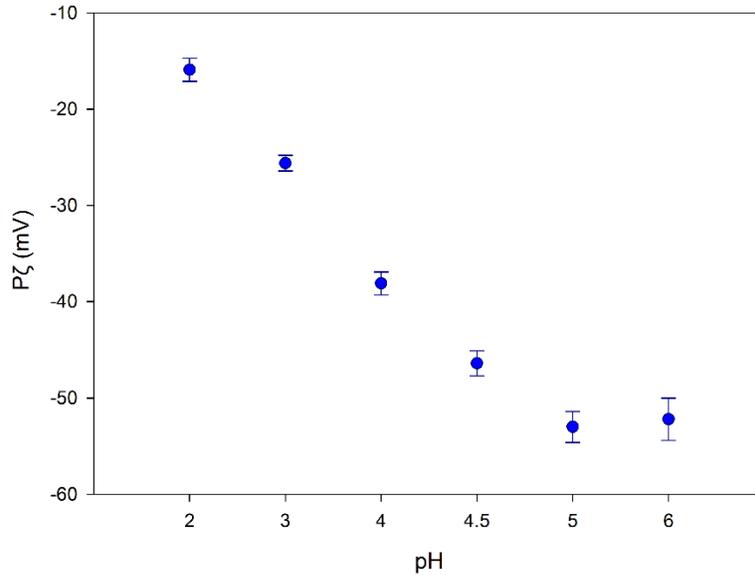


Figura 2-12. Potencial- ζ del EPS clarificado (1%) de *Haloferax mucosum*. Los datos representan el promedio de 9 muestras analizadas con sus desviaciones estándar.

2.4.6 PROPIEDADES DE FLUJO

Las propiedades de flujo en solución acuosa del EPS 1% (v/v) producido por *Haloferax mucosum* se muestran en la [Figura 2-13](#). La viscosidad de la solución polimérica disminuyó con el aumento del cizallamiento. La ecuación de Ostwald-de Waele (Ley de potencia) fue utilizada para el ajuste de esta curva de flujo ($R^2= 0.99$). El EPS mostró un índice de flujo (n) de 0.84 y un índice de consistencia de $0.0347 \text{ Pa}\cdot\text{s}^{0.84}$, lo cual denota un comportamiento no newtoniano del tipo pseudoplástico.

Las propiedades de flujo dependen de los parámetros estructurales del EPS, como la masa molar, la distribución de sus sustituyentes, el grado de ramificación etc ([Lira-Ortiz et al., 2014](#)).

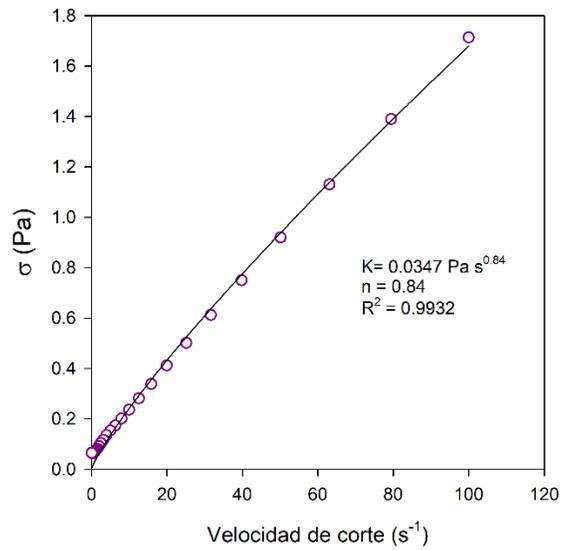


Figura 2-13. Curva de flujo del EPS purificado producido por *Haloferax mucosum* (1%). La línea representa el ajuste a Modelo reológico de Ostwald de Waele.

2.5 CONCLUSIONES

Haloferax mucosum (DSM 27191) es una arquea halófila capaz de producir exopolisacáridos (EPS) y de manera simultánea acumular polihidroxicanoatos (PHA) en medio de cultivo modificado (ATCC 2185, NaCl 2.5 M y C/N=35), alcanzando un rendimiento en el EPS de 1.32 g_{EPS}/g_{Biomasa} y en el PHA de 0.011 g_{PHA}/g_{biomasa} a las 144 h de fermentación. Las variaciones en la composición del medio de cultivo afectan significativamente el crecimiento celular, la producción de EPS y la acumulación de PHA. Cuando la concentración de la fuente de carbono está en exceso y la disponibilidad de nitrógeno es menor, la co-producción de PHA es favorecida (C/N= 35). Las condiciones de fermentación influyen en la composición química y estructural de los polímeros obtenidos.

Dentro la composición química básica del EPS producido por *Haloferax mucosum*, el 85.23 ± 0.04 % representa a los carbohidratos totales, el 13.99 ± 0.08 % a las proteínas y 0.63 ± 0.03 % a los grupos sulfatos. El EPS es un heteropolisacárido aniónico compuesto principalmente de monómeros de glucosa (36.19 %, p/p), galactosa (18.24 %, p/p) y un tercer monómero no identificado; tiene una masa molar de 901.12 kDa. El EPS en solución presenta comportamiento reológico pseudoplástico con un índice de flujo (n) de 0.84.

2.6 BIBLIOGRAFÍA

- Allen, M. A., Goh, F., Leuko, S., Echigo, A., Mizuki, T., Usami, R., . . . Burns, B. P. (2008). *Haloferax elongans* sp. nov. and *Haloferax mucosum* sp. nov., isolated from microbial mats from Hamelin Pool, Shark Bay, Australia. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 58(Pt 4), 798-802. doi:10.1099/ijs.0.65360-0
- Antón, J., Meseguer, I., & Rodriguez-Valera, F. (1988). Production of an extracellular polysaccharide by *Haloferax mediterranei*. *Environmental Microbiology*, 54(10), 2381-2386.
- Aragón-León, A., Moreno-Vilet, L., González-Ávila, M., Mondragón-Cortez, P. M., Sasaki, G. L., Martínez-Pérez, R. B., & Camacho-Ruíz, R. M. (2023). Inulin from halophilic archaeon *Haloarcula*: Production, chemical characterization, biological, and technological properties. *Carbohydrate Polymers*, 121333.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Cano-Sarmiento, C., Téllez-Medina, D., Viveros-Contreras, R., Cornejo-Mazón, M., Figueroa-Hernández, C., García-Armenta, E., . . . Gutiérrez-López. (2018). Zeta potential of food matrices. *Food Engineering Reviews*, 10, 113-138.
- Canovas, V., Garcia-Chumillas, S., Monzó, F., Simó-Cabrera, L., Fernández-Ayuso, C., Pire, C., & Martínez-Espinosa, R. M. (2021). Analysis of Polyhydroxyalkanoates Granules in *Haloferax mediterranei* by Double-Fluorescence Staining with Nile Red and SYBR Green by Confocal Fluorescence Microscopy. *Polymers*, 13(10). doi:10.3390/polym13101582
- Cui, Y.-W., Gong, X.-Y., Shi, Y.-P., & Wang, Z. D. (2017). Salinity effect on production of PHA and EPS by *Haloferax mediterranei*. *RSC Advances*, 7(84), 53587-53595.
- Cui, Y.-W., Shi, Y.-P., & Gong, X.-Y. (2017). Effects of C/N in the substrate on the simultaneous production of polyhydroxyalkanoates and extracellular polymeric substances by *Haloferax mediterranei* via kinetic model analysis. *RSC Advances*, 7(31), 18953-18961. doi:10.1039/c7ra02131c
- Donot, F., Fontana, A., Baccou, J. C., & Schorr-Galindo, S. (2012). Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. *Carbohydrate Polymers*, 87(2), 951-962. doi:10.1016/j.carbpol.2011.08.083
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3), 350-356.
- Dussault, H. (1955). An improved technique for staining red halophilic bacteria. *Journal of bacteriology*, 70(4), 484.
- Finore, I., Lama, L., Poli, A., Di Donato, P., & Nicolaus, B. (2015). Biotechnology Implications of Extremophiles as Life Pioneers and Wellspring of Valuable Biomolecules. In B. Biodiversity, Bioactive Molecules (Ed.), *Microbial Factories* (Vol. 2, pp. 193-216).
- Flemming. (2010). The biofilm matrix. *Nature reviews microbiology*, 8(9), 623-633.

- Flemming. (2011). The perfect slime. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 86(2), 251-259. doi:10.1016/j.colsurfb.2011.04.025
- Flores-Huicochea, E., Rodríguez-Hernández, A. I., Espinosa-Solares, T., & Tecante, A. (2013). Sol-gel transition temperatures of high acyl gellan with monovalent and divalent cations from rheological measurements. *Food Hydrocolloids*, 31(2), 299-305.
- Grant, W. (2001). Class III. Halobacteria class nov. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 1, 294-301.
- Guo, M. Q., Hu, X., Wang, C., & Ai, L. (2017). Polysaccharides: structure and solubility. *Solubility of polysaccharides*, 2, 8-21.
- Hamidi, M., Mirzaei, R., Delattre, C., Khanaki, K., Pierre, G., Gardarin, C., . . . Faezi, S. (2019). Characterization of a new exopolysaccharide produced by *Halorubrum* sp. TBZ112 and evaluation of its anti-proliferative effect on gastric cancer cells. *3 Biotech*, 9(1), 1-8.
- Haroun-Bouhedja, F., Ellouali, M., Siquin, C., & Boisson-Vidal, C. (2000). Relationship between sulfate groups and biological activities of fucans. *Thrombosis research*, 100(5), 453-459.
- Instruments, M. (2013). Zetasizer nano series user manual. MAN, 1, 2013.
- Joulak, Finore, I., Nicolaus, B., Leone, L., Moriello, A. S., Attia, H., . . . Azabou, S. (2019). Evaluation of the production of exopolysaccharides by newly isolated *Halomonas* strains from Tunisian hypersaline environments. *International journal of biological macromolecules*, 138, 658-666.
- Kalita, D., & Joshi, S. (2017). Study on bioremediation of Lead by exopolysaccharide producing metallophilic bacterium isolated from extreme habitat. *Biotechnology reports*, 16, 48-57.
- Kim, Y. B., & Rhee, Y. H. (2000). Evaluation of various carbon substrates for the biosynthesis of polyhydroxyalkanoates bearing functional groups by *Pseudomonas putida*. *International journal of biological macromolecules*, 28(1), 23-29.
- Koller. (2015). Study on the Production and Re-use of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and Extracellular Polysaccharide by the Archaeon *Haloferax mediterranei* Strain DSM 1411. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 29(2), 87-98. doi:10.15255/cabeq.2014.2058
- Koyanagi, S., Tanigawa, N., Nakagawa, H., Soeda, S., & Shimeno, H. (2003). Oversulfation of fucoidan enhances its anti-angiogenic and antitumor activities. *Biochemical pharmacology*, 65(2), 173-179.
- Kunioka, M., & Kawaguchi, Y. (1989). Production of biodegradable copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 4-hydroxybutyrate by *Alcaligenes eutrophus*. *Applied microbiology biotechnology reports*, 30(6), 569-573.
- Lira-Ortiz, A. L., Reséndiz-Vega, F., Ríos-Leal, E., Contreras-Esquivel, J. C., Chavarría-Hernández, N., Vargas-Torres, A., & Rodríguez-Hernández, A. I. (2014). Pectins from waste of prickly pear fruits (*Opuntia albicarpa* Scheinvar 'Reyna'): Chemical and rheological properties. *Food Hydrocolloids*, 37, 93-99.
- Litchfield, C. D. (2011). Potential for industrial products from the halophilic Archaea. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38(10), 1635.

- Llamas, I., Amjres, H., Mata, J. A., Quesada, E., & Béjar, V. (2012). The potential biotechnological applications of the exopolysaccharide produced by the halophilic bacterium *Halomonas almeriensis*. *Molecules*, 17(6), 7103-7120.
- López-Ortega, M. A., Chavarría-Hernández, N., López-Cuellar, M. D. R., & Rodríguez-Hernández, A. I. (2021). A review of extracellular polysaccharides from extreme niches: An emerging natural source for the biotechnology. From the adverse to diverse! *International journal of biological macromolecules*, 177, 559-577. doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.02.101
- López-Ortega, M. A., Rodríguez-Hernández, A. I., Camacho-Ruíz, R. M., Córdova, J., López-Cuellar, M. D. R., Chavarría-Hernández, N., & González-García, Y. (2020). Physicochemical characterization and emulsifying properties of a novel exopolysaccharide produced by haloarchaeon *Haloferax mucosum*. *International journal of biological macromolecules*, 142, 152-162. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.09.087
- López-Ortega, M. A., Rodríguez-Hernández, A. I., Chavarría-Hernández, N., López-Cuellar, M. d. R., González-García, Y., Córdova, J., . . . Camacho-Ruíz, R. M. (2022). Extracellular Polysaccharide Synthesized by the Halophilic Bacterium *Salibacterium halochares* STm, Isolated from Gypsum Dunes: Production, Physicochemical Characterization and Emulsifying Properties. *Journal of Polymers the Environment*
- Lu, Y., Lu, H., Wang, S., Han, J., Xiang, H., & Jin, C. (2017). An Acidic Exopolysaccharide from *Haloarcula hispanica* ATCC33960 and Two Genes Responsible for Its Synthesis. *Archaea*, 2017, 5842958. doi:10.1155/2017/5842958
- Madison, L. L., & Huisman, G. W. (1999). Metabolic engineering of poly (3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiology and molecular biology reviews*, 63(1), 21-53.
- Miller, G. (1959). Modified DNS method for reducing sugars. *Analytical chemistry*, 31(3), 426-428.
- Morales-Martínez, Y., López-Cuellar, M. d. R., Chavarría-Hernández, N., & Rodríguez-Hernández, A. I. (2018). Rheological behaviour of acetylated pectins from cactus pear fruits (*Opuntia albicarpa* and *O. matudae*). *Food Hydrocolloids*, 85, 110-119. doi:10.1016/j.foodhyd.2018.07.009
- Nicolaus, B., Kambourova, M., & Oner, E. T. (2010). Exopolysaccharides from extremophiles: from fundamentals to biotechnology. *Environ Technol*, 31(10), 1145-1158. doi:10.1080/09593330903552094
- Nicolaus, B., Lama, L., Esposito, E., & Manca, M. C. (1999). *Haloarcula* spp able to biosynthesize exo- and endopolymers. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 23, 489-496.
- Obruca, S., Sedlacek, P., & Koller, M. (2021). The underexplored role of diverse stress factors in microbial biopolymer synthesis. *Bioresource Technology Reports*, 326, 124767.
- Padhan, M. (2021). Extremophiles: A Versatile Source of Exopolysaccharide. In *Microbial Exopolysaccharides as Novel and Significant Biomaterials* (pp. 105-120).

- Paramonov, N. A., Parolis, L. A., Parolis, H., Boán, I. F., Antón, J., & Rodríguez-Valera, F. (1998). The structure of the exocellular polysaccharide produced by the Archaeon *Haloferax gibbonsii*. *Carbohydrate Research*, 309.
- Parolis, H., Parolis, L. A., Boán, I. F., Rodríguez-Valera, F., Widmalm, G., Manca, M. C., . . . Sutherland, I. W. (1996). The structure of the exopolysaccharide produced by the halophilic Archaeon *Haloferax mediterranei* strain R4 (ATCC 33500). *Carbohydrate Research*, 295, 147-156.
- Poli, Anzelmo, G., & Nicolaus, B. (2010). Bacterial exopolysaccharides from extreme marine habitats: production, characterization and biological activities. *Mar Drugs*, 8(6), 1779-1802. doi:10.3390/md8061779
- Poli, Di Donato, P., Tommonaro, G., Abbamondi, G. R., Finore, I., & Nicolaus, B. (2018). Exopolysaccharide-Producing Microorganisms from Extreme Areas: Chemistry and Application. In *Extremophiles in Eurasian Ecosystems: Ecology, Diversity, and Applications* (pp. 405-433).
- Rodríguez-Hernández, A., Durand, S., Garnier, C., Tecante, A., & Doublier, J. L. (2003). Rheology-structure properties of gellan systems: evidence of network formation at low gellan concentrations. *Food Hydrocolloids*, 17(5), 621-628.
- Rodríguez-Valera, F., Juez, G., & Kushner. (1982). Halocins: salt-dependent bacteriocins produced by extremely halophilic rods. *Canadian Journal of Microbiology*, 28(1), 151-154.
- Sarilmiser, H. K., Ates, O., Ozdemir, G., Arga, K. Y., & Oner, E. T. (2015). Effective stimulating factors for microbial levan production by *Halomonas smyrnensis* AAD6T. *Journal of bioscience bioengineering*, 119(4), 455-463.
- Shi, H.-P., Lee, C.-M., & Ma, W.-H. (2007). Influence of electron acceptor, carbon, nitrogen, and phosphorus on polyhydroxyalkanoate (PHA) production by *Brachymonas* sp. P12. *Microbiology Biotechnology*, 23(5), 625-632.
- Spano, A., Gugliandolo, C., Lentini, V., Maugeri, T. L., Anzelmo, G., Poli, A., & Nicolaus, B. (2013). A novel EPS-producing strain of *Bacillus licheniformis* isolated from a shallow vent off Panarea Island (Italy). *Current microbiology*, 67(1), 21-29. doi:10.1007/s00284-013-0327-4
- Squillaci, G., Finamore, R., Diana, P., Restaino, O. F., Schiraldi, C., Arbucci, S., . . . Morana, A. (2016). Production and properties of an exopolysaccharide synthesized by the extreme halophilic archaeon *Haloterrigena turkmenica*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(2), 613-623. doi:10.1007/s00253-015-6991-5
- Sutherland, I. W. (2001). The biofilm matrix—an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in microbiology*, 9(5), 222-227.
- Ventosa, A., Márquez, M. C., Sánchez-Porro, C., & de la Haba, R. R. (2012). Taxonomy of halophilic archaea and bacteria. *Advances in understanding the biology of halophilic microorganisms*, 59-80.
- Ventosa, A., & Nieto, J. (1995). Biotechnological applications and potentialities of halophilic microorganisms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11, 85-94.
- Vreeland, R. H. (2012). *Advances in understanding the biology of halophilic microorganisms*: Springer.
- Webber, V., Carvalho, S. M. d., Ogliari, P. J., Hayashi, L., & Barreto, P. L. M. (2012). Optimization of the extraction of carrageenan from *Kappaphycus alvarezii*

using response surface methodology. *Food Science and Technology*, 32(4), 812-818. doi:10.1590/s0101-20612012005000111

Xu, Y., Li, Y., You, X., Pei, C., Wang, Z., Jiao, S., . . . Jin, C. (2022). Novel insights into the sulfated glucuronic acid-based anti-SARS-CoV-2 mechanism of exopolysaccharides from halophilic archaeon *Haloarcula hispanica*. *Frontiers in chemistry*, 10.

CAPÍTULO 3
PRODUCCIÓN, RECUPERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN
DE POLIHIDROXIALCANOATOS ARQUEALES
PRODUCIDOS POR LA ARQUEA HALÓFILA *Haloferax*
mucosum

3.1 INTRODUCCIÓN

Los bioplásticos, han surgido como una alternativa ante el problema de la contaminación por plásticos derivados del petróleo. Entre los diferentes bioplásticos, el polihidroxialcanoato (PHA), gracias a su biodegradabilidad (aerobia y anaerobiamente), biocompatibilidad y propiedades mecánicas, es el biopolímero que por “excelencia” sustituiría en un futuro a los plásticos derivados del petróleo (Q. Lu, Han, Zhou, Zhou, & Xiang, 2008; Mahansaria et al., 2020).

Las arqueas halófilas son los candidatos perfectos para la producción de estos bioplásticos a nivel industrial, sin embargo, no han sido suficientemente estudiadas. Las ventajas de trabajar en condiciones no estériles gracias a la baja probabilidad de contaminación por el alto contenido salino, no es la única razón que hace interesante trabajar con microorganismos halófilos, sino al PHA que estas son capaces de acumular intracelularmente, entre los géneros haloarqueales reportados como productores de PHA están *Haloferax*, *Halobacterium*, *Haloarcula* y *Haloquadratum*, esta acumulación se debe a las condiciones de estrés que enfrentan las células (Cui, Gong, et al., 2017; Cui, Shi, et al., 2017; Q. Lu et al., 2008; Shrivastav, Mishra, & Mishra, 2010).

Haloferax mucosum, es una arquea halófila extrema, lo que significa que depende de un alto contenido de sal para poder vivir. En el Capítulo anterior observamos que en concentraciones de 2.5 M de NaCl es capaz de producir estos PHA y EPS, la concentración de sal puede regular la producción de PHA; cuando aumenta la salinidad, la presión osmótica inhibe la respiración celular y la fuente de carbono en exceso tiende a influir en el almacenamiento de los biopolímeros (Cui, Gong, et al., 2017).

Es por lo que en este capítulo se modificarán las condiciones de salinidad y la relación de C/N; aumentando la concentración de NaCl de 2.5 a 4 M y C/N=48 y con ello evaluar el efecto del incremento en la presión osmótica sobre la síntesis de EPS y PHA por *Haloferax mucosum*.

3.2 ANTECEDENTES

3.2.1 POLIHIDROXIALCANOATOS (PHA)

Los polihidroxicanoatos (PHA) son una familia heterogénea de poliésteres sintetizados natural y exclusivamente por procariotas (eubacterias y algunas especies de halobacterias), estos son acumulados dentro de la célula como un material de almacenamiento de carbono y energía bajo condiciones restringidas (fuente de carbono, fósforo, nitrógeno, oxigenación, altas concentraciones de sal, etc.) (Bhattacharyya et al., 2012; Pramanik et al., 2012).

Estos bioplásticos tienen grandes ventajas gracias a sus propiedades mecánicas, biodegradabilidad y biocompatibilidad, por lo que tienen un uso potencial en diversas áreas de la industria (Mahansaria et al., 2020).

Estos biopolímeros son insolubles en agua, pero altamente solubles en compuestos clorados y se caracterizan principalmente por su peso molecular, la distribución de sus monómeros, temperatura de fusión y transición vítrea (Simo-Cabrera et al., 2021).

3.2.2 ESTRUCTURA QUÍMICA

Las moléculas de PHA se han conocido como biopolioxoésteres ópticamente activos y compuestos de unidades monoméricas de ácidos grasos (R)-3-hidroxi, con un grupo R en la cadena lateral (Simo-Cabrera et al., 2021).

Sus propiedades fisicoquímicas dependen de la composición química y la estructura de su unidad monomérica, es por lo que, pueden clasificarse en diferentes grupos.

Dependiendo de su naturaleza química (Giin-Yu, Chia-Lung, Ling, Liya, & Lin, 2014; Kumar et al., 2020):

1. PHA que contienen ácidos grasos alifáticos.
2. PHA que contienen ácidos grasos aromáticos.
3. Heteropolímeros de PHA, que contienen ambos ácidos grasos.

Por el número de átomos de carbono en su unidad monomérica (Poltronieri & Kumar, 2017):

1. PHA de cadena corta (hidroxipropionato (3HB-co-HP), hidroxibutirato (3HB-co-4HB), e hidroxivalerato (3HB-co-HV)).
2. PHA de cadena mediana (hidroxihexanoato, hidroxieptanoato, hidroxidecanoato, e hidroxidodecanoato).
3. PHA de cadena larga.

Dependiendo de la composición química de sus monómeros y la distribución en la cadena polimérica (Poltronieri & Kumar, 2017):

1. Homopolímeros: Compuestos de un solo tipo de monómero.
2. Copolímeros aleatorios: Compuestos de más de un tipo de monómeros distribuidos aleatoriamente, como por ejemplo el poli(3HP-co-4HB), poli(3HB-co-3HP), poli(3HB-co-3HV) (PHBV), etc.
3. Copolímeros en bloque: Se caracterizan principalmente por unidades monoméricas distintas que se agrupan en bloques discretos a lo largo de la cadena polimérica, un ejemplo es el PHB-co-PHBV.

3.2.3 MÉTODO PARA LA DETECCIÓN DE MICROORGANISMOS PRODUCTORES Y NO PRODUCTORES DE PHA/PHB.

Cuando se aísla un nuevo microorganismo del cual se tiene la hipótesis de su potencial producción de poliésteres, los protocolos de detección incluyen cromóforos con afinidad a los compuestos lipofílicos:

1. Negro Sudan B (C₂₉H₂₄N₆).
2. Rojo y Azul Nilo, Son colorantes orgánicos altamente fluorescentes y fotoestables pertenecientes a la familia de las benzofenoxazinas y son de naturaleza lipofílica. Ambos colorantes fluorescentes son particularmente útiles para visualizar estructuras celulares hidrofóbicas, como membranas o inclusiones similares a lípidos (gránulos de PHA), tienen mayor afinidad por los PHB que el negro Sudán y por microscopía de fluorescencia pueden obtenerse mejores imágenes.

3.2.4 RUTAS METABÓLICAS PARA LA PRODUCCIÓN DE PHA

Diversas investigaciones han descrito ampliamente que las condiciones de crecimiento desequilibrado de algunos microorganismos dan como resultado la acumulación de polihidroxicanoatos en su interior como fuente de carbono y energía para poder sobrevivir a las adversidades que enfrentan, como por ejemplo los factores de pH, la fuente de carbono, la oxigenación, la temperatura, entre otros.

La fuente de carbono que estos *microorganismos* productores consumen influye significativamente en la desviación de las rutas metabólicas para la producción de este bioplástico, sin embargo, la principal ruta que los microbios utilizan para esta producción es el acetil-CoA. En la [Figura 3-1](#) se ilustra la ruta metabólica propuesta por [Koller, 2019](#) para *Cupriavidus necator* y *Hfx. mediterranei*.

La acumulación intracelular de estos gránulos de PHA puede llegar a representar en algunos microorganismos hasta un 90% (v/v) de la masa total de las células secas.

Diferentes haloarqueas han sido reportadas como productoras de PHA cuando son crecidas en diferentes condiciones de cultivo. En la [Tabla 3-1](#) se presenta un resumen algunos estudios sobre acumulación de PHA por arqueas halófilas. Las arqueas halófilas más estudiadas para la producción de PHA son *Haloferax mediterranei* y *Halogeometricum borinquense*. En la mayoría de los trabajos experimentales se ha utilizado glucosa como fuente simple de carbono, sin embargo, para que los costos de producción sean más asequibles se ha propuesto el uso de subproductos provenientes de procesos agroalimentarios como el suero de leche y las melazas. Si bien, diferentes trabajos han reportado la acumulación de PHA y las condiciones de producción, la mayoría de las veces los reportes se refieren a mejorar los rendimientos, sin embargo, la caracterización química de los PHA es reportada en menor medida.

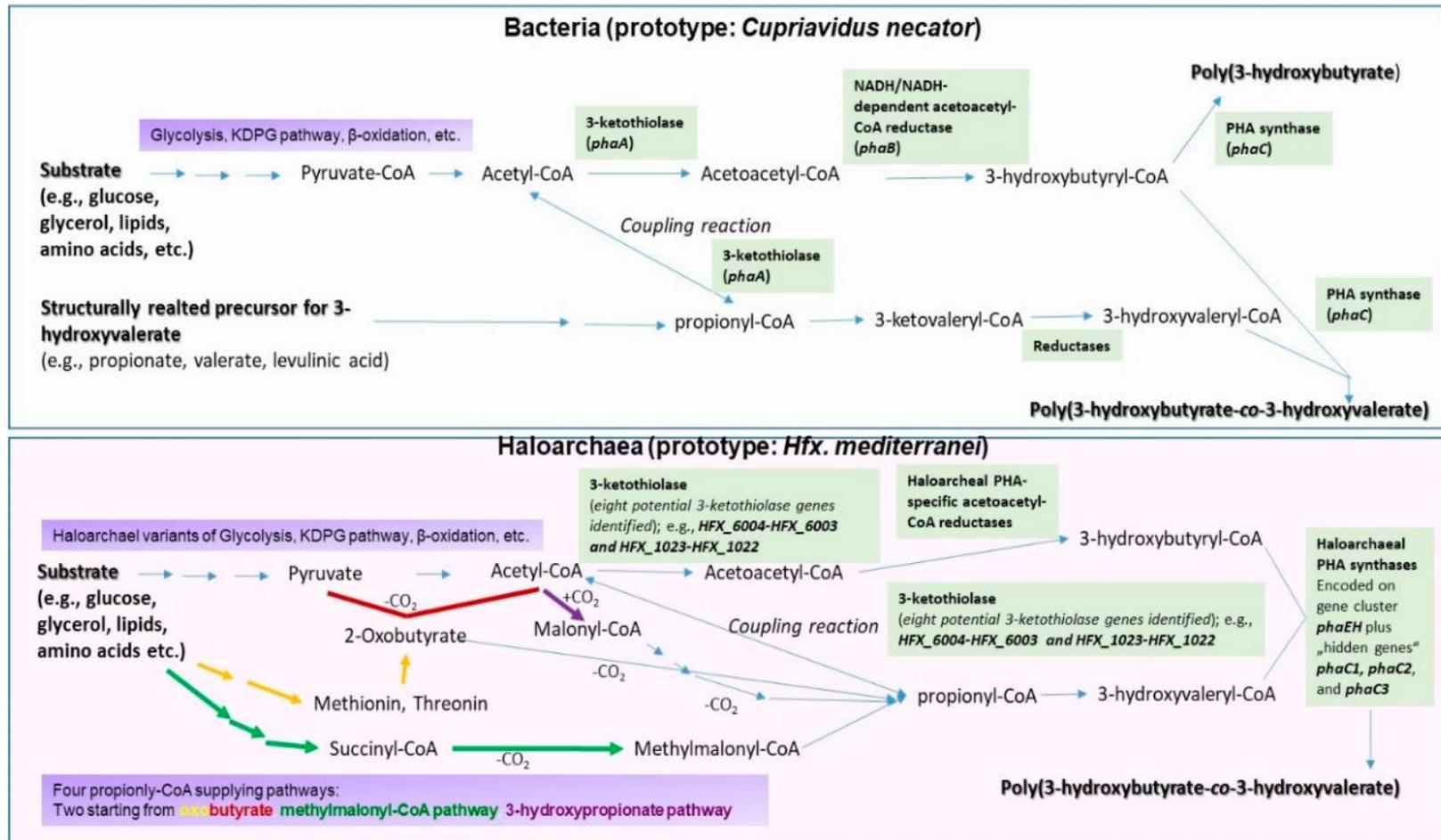


Figura 3-1. Rutas metabólicas para la síntesis de PHA en bacterias y haloarqueas, de acuerdo con Koller, 2019.

Tabla 3-1. Resumen de algunos estudios sobre la producción de polihidroxicanoatos (PHA) acumulados por diferentes especies de arqueas halófilas en cultivo sumergido.

Microorganismo	Fuente de carbono y nitrógeno	Condiciones de producción	Productividad volumétrica (gL ⁻¹ h ⁻¹)	Acumulación de PHA por MCS (%)	Caracterización química de PHA	Referencia
<i>Haloferax mediterranei</i> (DSM 1411)	Vinaza pretratada (25 y 50 %, v/v) E.L. (1.0 g/L)	Tipo de cultivo: Matraz agitado (lote) Medio de producción: Medio MST <u>no estéril</u> (g/L): MgSO ₄ ·7H ₂ O (20.0); KCl (2.0); C ₅ H ₈ NNaO ₄ (1.0); KH ₂ PO ₄ (0.0375); FeSO ₄ ·7H ₂ O (0.05); E.L (1.0). pH 7.2 Salinidad (NaCl [g/L]): 200 37 °C a 180 rpm por 120 h	0.210	70	PHBHV P(3HB-co-3HV) Masa molar NR Propiedades térmicas NR	(Bhattacharyya et al., 2012)
<i>Haloferax mediterranei</i> (ATCC 33500)	Aguas residuales de melazas E.L. (10 g/L)	Tipo de cultivo: Matraz agitado (2.5 L) Salinidad (NaCl [g/L]): 150 g/L Medio de cultivo: Medio CM (g/L): casaminoácidos (7.5); E.L. (10); citrato de sodio (3); MgSO ₄ ·7H ₂ O (20); KCl (2); Fe ²⁺ (0.01) pH: 7.2 37 °C a 150 rpm	0.390-0.620	NR	NR	(Cui, Zhang, et al., 2017)
<i>Haloferax mediterranei</i> (ATCC 33500)	Glucosa (10 g/L) E.L. (10 g/L)	Tipo de cultivo: Fermentador <i>Air lift</i> (1.2 L) Medio de producción: MgCl ₂ ·6H ₂ O (13), CaCl ₂ ·2H ₂ O (0.69), KCl (4), MgSO ₄ ·7H ₂ O (20), NaHCO ₃ (0.25), NaBr (0.5), glucosa (10), NH ₄ Cl (0.48). Salinidad (NaCl [g/L]): 75, 150, 200 y 250 37 °C	NR	NaCl 250 g/L: 7.1.1	PHBHV P(3HB-co-3HV) Masa molar NR Propiedades térmicas NR	(Cui, Gong, et al., 2017)
<i>Haloferax mediterranei</i> (DSM 1411)	Glucosa Sales de amonio o nitrato de potasio	Tipo de cultivo: Matraz agitado (Lote) Salinidad (NaCl [g/L]): 156 g/L Relaciones C/N: A) 8; B) 17,34 y 42 Preinóculo: 48 h a 200 rpm en medio MS (g/L): MgCl ₂ ·6H ₂ O (13), MgSO ₄ ·7H ₂ O (20), CaCl ₂ ·6H ₂ O (1), KCl (4), NaHCO ₃ (0.2), NaBr (0.5), glucosa (10) y E.L. (5). Medio de producción: Medio MS adicionado con KH ₂ PO ₄ (0.5), FeCl ₃ (0.005), ácido sulfónico 1,4-piperazinedietano- (PIPES) (15). 168 h a 37 °C y 200 rpm	0.350	4.6 – 9.3	PHBHV P(3HB-co-3HV) Masa molar M _n : 61.27 kDa M _w : 210.78 Da PDI (M _w / M _n): 3.44	(Ferre-Guell & Winterburn, 2017)

Continuación de la Tabla 3-1

Microorganismo	Fuente de carbono y nitrógeno	Condiciones de producción	Productividad volumétrica (gL ⁻¹ h ⁻¹)	Acumulación de PHA por MCS (%)	Caracterización química de PHA	Referencia
<i>Haloferax mediterranei</i> (ATCC 33500)	Glucosa Xilosa Fructosa Hidrolizado de microalga <i>Ulva</i> sp. E.L. (0.5% p/v)	Tipo de cultivo: Frascos Duran (Lote) Medio de producción: Medio Hv-YPC (g/L): MgSO ₄ ·7H ₂ O (21), MgCl ₂ ·6H ₂ O (18), KCl (4.2), 12mM Tris HCl (pH 7.5). E.L (5); Peptona (1) y casaminoácidos (1), fuente de carbono (20) o hidrolizado de <i>Ulva</i> sp. (25%, p/p) pH 7.2 42 °C a 180 rpm por 48 h Salinidad (NaCl [g/L]): 144 pH: 7.0-7.2	0.035	Glucosa: 66.67 Fructosa: 44.20 Xilosa: 33.4 <i>Ulva</i> sp.: 48.15	PHBV: P(3HB-co-3HV) Masa molar NR Propiedades térmicas T _m : 150 °C	(Ghosh et al., 2019)
<i>Haloferax mediterranei</i> (ATCC 33500)	Hidrolizado de microalga <i>Ulva</i> sp. Peptona	Tipo de cultivo: Biorreactor agitado neumáticamente construido de botellas de PET Medio de producción: Medio Hv-YPC (g/L): MgSO ₄ ·7H ₂ O (21), MgCl ₂ ·6H ₂ O (18), KCl (4.2), 112mM Tris HCl (pH 7.5), NaCl (144). E.L (5); Peptona (1) y casaminoácidos (1), hidrolizado de <i>Ulva</i> sp. (25%, p/p) pH 7.2 42 °C a 180 rpm por 48 h Salinidad (NaCl [g/L]): 144 pH: 7.0-7.2	27.0	56	PHBV: P(3HB-co-3HV) Masa molar M _n : 504 kDa M _w : 811 kDa PDI (M _w / M _n) 1.608 Propiedades térmicas T _d : 248 °C	(Ghosh et al., 2022)
<i>Halogeometricum borinquense</i> E3	Glucosa (20%, p/v) E.L.	Tipo de cultivo: Matraz agitado Medio de producción: Medio NGSM (g/L): E.L. (1.0); MgCl ₂ ·6H ₂ O (13); KCl (4.0); CaCl ₂ ·2H ₂ O (1.0); NaHCO ₃ (0.2); NH ₄ Cl (2); KH ₂ PO ₄ (0.5); FeCl ₃ ·6H ₂ O (0.005). Salinidad (NaCl [g/L]): 200 pH: 7.0-7.2	0.210	73.51±1.7	PHBV: P(3HB-co-3HV) Propiedades térmicas T _m : 138 °C (T _m ¹) y 154.5 °C (T _m ²)	(Salgaonkar & Bragança, 2015)
<i>Halogeometricum borinquense</i> RM-G1	Glicerol, fructosa, citrato, sacarosa, maltosa, lactosa, glucosa y almidón (10 g/L) Casaminoácidos, Triptona, peptona, E.L., soyatone (1g/L)	Tipo de cultivo: Biorreactor Medio de producción: Medio HSM (g/L): E.L. (1.0); glucosa (10); citrato de sodio (3.0); KCl (2.0); MgSO ₄ ·7H ₂ O (20.0); FeSO ₄ ·4H ₂ O (0.05); KH ₂ PO ₄ (0.0375); MnCl ₂ ·4H ₂ O (0.00036). Salinidad (NaCl [g/L]): 250 37 °C a 100 rpm por 120 h Tiempo acumulación máxima: 72 h	0.206	66.80±1.69	PHBV: P(3HB-co-3HV) Masa molar M _n : 156.899 kDa M _w : 288.723 kDa PDI (M _w / M _n) 1.8 Propiedades térmicas T _g : -12.6 °C T _m : 139.1 °C (T _m ¹) y 152.5 °C (T _m ²)	(Mahansaria et al., 2020)

Continuación de la Tabla 3-1

Microorganismo	Fuente de carbono y nitrógeno	Condiciones de producción	Productividad volumétrica (gL ⁻¹ h ⁻¹)	Acumulación de PHA por MCS (%)	Caracterización química de PHA	Referencia
<i>Haloarcula marismortui</i> MTCC 1596	Vinazas E.L (1.0)	Tipo de cultivo: Matraz agitado (Lote) Medio de producción en medio NDM (g/L): MgSO ₄ ·7H ₂ O (20), KCl (2.0), FeSO ₄ ·4H ₂ O (0.05), MnCl ₂ ·4H ₂ O (0.00036), KH ₂ PO ₄ (0.0375), Glucosa (20) o vinaza (1% al 10%, 15%, 20%, 25%, 50%, 75%, y 100% v/v) y glutamato de sodio (1), E.L (1.0) Salinidad (NaCl [g/L]): 200 pH 7.2 37 °C durante 120 h	Medio NDM: 0.014 Medio con vinazas (10%, v/v): 0.015 Medio con vinazas pretratadas (100%, v/v): 0.020	Medio con vinazas (10%, v/v): 23% Medio con vinazas pretratadas (100%, v/v): 30%	PHB Masa molar NR Propiedades térmicas NR	(Pramanik et al., 2012)
<i>Halogramum amylolyticum</i> TNN58	Glucosa E.L	Tipo de cultivo: Biorreactor (7.5 L) Lote Medios de producción: Medio MG (g/L): Bacto E.L. (1), glutamato de sodio (1), MgSO ₄ ·7H ₂ O (20), KCl (2.0), FeSO ₄ ·4H ₂ O (0.005), MnCl ₂ ·4H ₂ O (0.00036), KH ₂ PO ₄ (0.00375), Glucosa (10). Medio NOMG (g/L): E.L. (0.05), peptona de pescado (0.25), piruvato de sodio (1), KCl (5.4), K ₂ HPO ₄ (0.3), CaCl ₂ (0.25), NH ₄ Cl (0.25), MgSO ₄ ·7H ₂ O (26.8), MgCl ₂ ·6H ₂ O (23), Glucosa (10). Medio AS-168 Salinidad (NaCl [g/L]): 200 pH: 7.0-7.2 37 °C durante 108 h a 220 rpm	NR	Medio AS-168: 5.6 Medio NOMG: 24.3 Medio MG: 26.6	PHBV P(3HB-co-3HV)	(Zhao et al., 2015)
Abreviaturas: E.L. extracto de levadura; MCS: masa de células secas; PHA: polihidroxialcanoato; PHBV: poly(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato); <i>M_n</i> : Peso molecular promedio numérico; <i>M_w</i> : Peso molecular promedio en peso; <i>T_d</i> : temperatura de degradación; <i>T_g</i> : temperatura de transición vítrea; <i>T_m</i> : temperatura de fusión; NR: no reportado						

3.2.5 PROPIEDADES DE LOS PHA

3.2.5.1 *Biológicas*

Una de las propiedades más interesantes de estos biopolímeros es su rápida biodegradabilidad. A diferencia de otros plásticos biodegradables, los PHA tienen la capacidad de degradarse no sólo en condiciones aerobias, sino también en anaerobias. Dentro de los tipos de PHA, aquellos de cadena media (mcl-3HA) tienen una cristalinidad baja, lo cual resulta en una degradación más rápida con enzimas microbianas.

Cabe recalcar que la biodegradación de estos biopolímeros no es posible a menos que las condiciones circundantes apoyen las actividades bióticas de los microorganismos responsables de la degradación ([Federle et al., 2002](#); [Noda, Lindsey, & Caraway, 2009](#)).

Se ha producido una gran variedad de PHA, los cuales tienen una amplia gama de propiedades físicas, dependiendo de su composición química (monómeros de hidroxiácidos constituyentes). Las variaciones en sus propiedades físicas incluyen Temperatura de fusión (T_m) con rangos de 40 °C y 180 °C, temperatura de transición vítrea (T_g) entre aproximadamente -55 °C y 5 °C, grado de cristalinidad de 0% y 80%, y porcentaje de elongación entre aproximadamente 5% y 500% ([Noda et al., 2009](#)).

3.2.5.2 *Propiedades térmicas de los PHA*

Las propiedades térmicas de los polímeros termoplásticos están definidas por la temperatura de transición-vítrea (T_g) y la temperatura de fusión (T_m), las cuales son medidas por calorimetría diferencial de barrido (DSC), en esta técnica de análisis térmico, el flujo de calor, hacia o desde una muestra, se mide en función de la temperatura o el tiempo. Otro análisis relacionado a las propiedades térmicas es el análisis termogravimétrico (TGA), el cual hace referencia a la pérdida de peso del polímero mientras se calienta, registrando su pérdida de masa en función de la temperatura, con el TGA se puede estudiar la estabilidad térmica del material ([Kalia, 2016](#)).

La T_g es la temperatura en que la región amorfa cambia de un estado vítreo a un estado gomoso, determinando las propiedades mecánicas del polímero. Cuando los valores de T_g se encuentran por arriba de la temperatura ambiental, los PHA tienden a ser duros, quebradizos y rígidos debido a la falta de movilidad entre las cadenas que la conforman. Por otro lado, la T_m es la temperatura a la cual la fase cristalina del polímero pasa a un estado líquido. La fase cristalina también está relacionada con la resistencia mecánica del polímero (Anjum et al., 2016; Bugnicourt, Cinelli, Lazzeri, & Alvarez, 2014; Laycock, Halley, Pratt, Werker, & Lant, 2013).

En la clase de los PHA, el PHB es el que tiene el punto de fusión más alto (Figura 3-2) (170-180 °C) debido a su alto grado de cristalinidad ($X_c = 55 - 65\%$), a diferencia de copolímeros como el PHBV el cual tiene una cristalinidad más baja y puntos de fusión más bajos, sin embargo sus propiedades dependen de la composición del 3-hidroxivalérico (Salim, Chan, Sudesh, & Gan, 2014). Esto se debe a que el 3HB y el 3HV tienen diferencias estructurales en un solo grupo metilo en la cadena lateral.

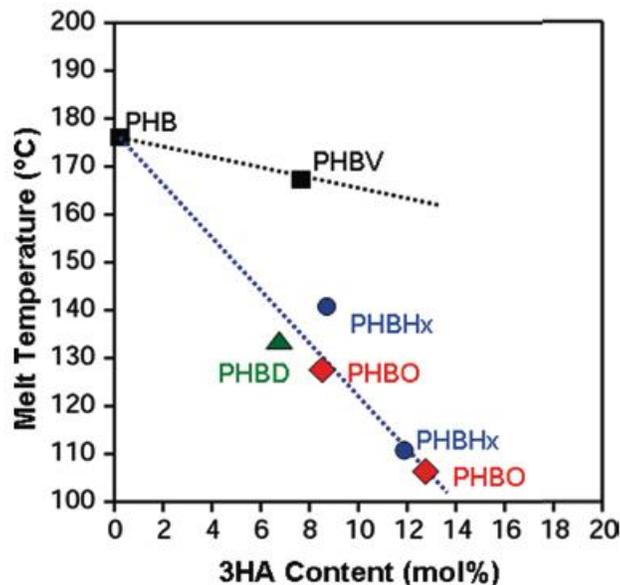


Figura 3-2. Temperaturas de fusión de copolímeros de PHA (Noda, Lindsey, & Caraway, 2009).

3.2.5.3 Otras propiedades

1. Propiedades mecánicas: El módulo de Young, la tensión de tracción y el módulo elástico determinan la rigidez de biopolímero. Una menor cristalinidad y T_g tienden a conducir a polímeros más blandos. Mientras que la disminución de los cristales en la región cristalina mejora la elongación y resistencia del PHA. El procesamiento de un copolímero por debajo de 160 °C es beneficioso y esto se logra cuando existen cadenas de HV incorporadas en la estructura. El PHBV muestra mejores propiedades mecánicas, alto módulo elástico y resistencia a la flexibilidad, baja resistencia a la tracción y baja elongación en el punto de fractura, diferente a un PHB (Kumar et al., 2020).

2. Transparencia: Aunque se han encontrado pocas respuestas ante esta propiedad, algunos autores describen que la transparencia óptica mejora cuando incrementa la porción amorfa del polímero.

3.3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.1 MICROORGANISMO PRODUCTOR Y MEDIO DE CULTIVO

La cepa de la arquea halófila *Haloferax mucosum* (DSM 27191) fue obtenida de la colección alemana *German Collection of Microorganisms and cell cultures GmbH* (DSMZ, alemán) y revitalizada y conservada según las indicaciones de la DSMZ. La cepa se revitalizó durante 20 días en incubadora a 37 °C en medio ATCC 2185 (NaCl, 4 M) y se conservó en ultracongelación (-72°C), en crioviales de 2 mL en medio GSW descrito por [López Ortega et al., \(2020\)](#). Los medios de activación, conservación y para preinóculo se describieron en el [Capítulo anterior](#).

Medio de producción

Para la exploración de síntesis de PHA el medio de cultivo ATCC 2185 se modificó incrementando el contenido de NaCl hasta 4 M y utilizando la relación de C/N=48.

*Preparación de preinóculo de *Haloferax mucosum**

Para promover el crecimiento de *Haloferax mucosum* en medio líquido, se inocularon 750 μL de cepa conservada en criovial en matraz Erlenmeyer que contenía 20 mL de medio de ATCC 2185 y se incubó a 37 °C durante 72 h en agitación orbital de 130 rpm.

Para determinar el medio de cultivo adecuado para la síntesis de PHA, las fermentaciones se realizaron en matraces Erlenmeyer bafleados de 500 mL, que contenía 100 mL de medio ATCC 2185 y éste se inoculó al 5% (v/v); las condiciones de fermentación se establecieron a 37 °C y 130 rpm y realizadas en una incubadora Barnstead, modelo MAX Q 5000. Se tomaron muestras de 100 mL a cada 24 h y concluyó a las 96 h. Durante las cinéticas se monitoreó el crecimiento celular por peso seco y densidad óptica (λ_{600}), el consumo de azúcares ([Miller, 1959](#)), evolución de pH y la producción de EPS y PHA.

La tasa máxima de crecimiento celular ($\mu_{m\acute{a}x}; h^{-1}$) fué determinada

mediante regresión no lineal de los datos de biomasa (x) ajustados a la ecuación logística de Gompertz de cuatro parámetros (Ecuación 1), utilizando el Software SigmaPlot 14.5 (Systat Software Inc., E.U.A.).

$$x(t) = y_0 + ae^{\left(-e^{-\left(\frac{t-x_0}{b}\right)}\right)} \quad (\text{Ec. 1})$$

$x(t)$ es la concentración de biomasa a cualquier tiempo, t (h)

x_0 , y_0 , a , y b son constantes de regresión.

El valor de $\mu_{m\acute{a}x}$ (h^{-1}) se estimó de acuerdo a la Ecuación 2:

$$\left(\left(\frac{d}{dt} x(t) \right) \times \frac{1}{x(t)} \right)_{m\acute{a}x} \quad (\text{Ec. 2})$$

La velocidad específica de consumo de glucosa $r_{cm\acute{a}x}$ ($g_{sustrato} h^{-1} g^{-1} x$) fue estimada mediante la Ecuación 1, utilizando el Software SigmaPlot 14.5 (Systat Software Inc., E.U.A.).

El valor de $r_{cm\acute{a}x} g_{sustrato} h^{-1} g^{-1} x$ se estimó de acuerdo a la Ecuación 4:

$$\left(- \left(\frac{d}{dt} c(t) \right) \times \frac{1}{x(t)} \right)_{m\acute{a}x} \quad (\text{Ec. 4})$$

3.3.2 DETECCIÓN DE ACUMULACIÓN DE GRÁNULOS DE PHA USANDO MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE FASES

La acumulación intracelular del poliéster de polihidroxialcanoato (PHA) se detectó por microscopía de contraste de fases durante la cinética de crecimiento (96 h), usando un Microscopio Nikon Eclipse Ci con Lámpara UV y contraste de fases, las observaciones se realizaron con un aumento de 400×.

El fluoróforo rojo Nilo (SIGMA, #063K3730V) se disolvió en acetona pura grado HPLC para obtener una solución madre de 1 mg/mL. La tinción de las células con el fluoróforo, se realizó como a continuación se describe: un mililitro de caldo

fermentado fue centrifugado a 12,000 rpm, 3 min a 4 °C en centrífuga refrigerada, posteriormente el sobrenadante fue descartado y las células fueron suspendidas en solución salina al 0.9% (p/v), este paso fue repetido 3 veces para eliminar el exceso de cristales de sal presente. Finalmente, el sobrenadante se descartó y las células fueron teñidas con 10 μ L de la solución de rojo Nilo. Para observarlas al microscopio, se tomaron 25 μ L de la suspensión de las células teñidas y se colocaron en un portaobjeto. Se tomaron imágenes de las células con el software Imagen-Pro Premier®.

3.3.3 RECUPERACION DEL PHA

La recuperación del PHA (Figura 3-3) se realizó de acuerdo al método descrito por Koller (2015) con ligeras modificaciones. Las células fueron separadas del caldo de fermentación por centrifugación (6000 rpm, 60 min, 4 °C). La biomasa recuperada se secó hasta peso constante a 70 °C en un horno de convección Shel-Lab (Modelo 1380FX). Después, la biomasa se trituró usando un mortero y la biomasa pulverizada fue incorporada en etanol (15 mL/g_{células secas}) manteniendo la solución etanólica-células en agitación magnética durante 24 h. Posteriormente, la suspensión etanólica de biomasa, libre de pigmentos y lípidos, se filtró a través de una membrana de celulosa (0.45 μ m) utilizando una bomba de vacío en un matraz kitasato y la biomasa se secó por convección a 70 °C hasta peso constante. Después, las células secas se resuspendieron en cloroformo (35 mL/g_{células}) en agitación magnética durante 20 h, seguido de esto, la muestra se calentó hasta 135 °C hasta obtener un volumen reducido al 5% del volumen inicial. Para recuperar el PHA soluble en cloroformo se recuperó en equipo de filtración al vacío (el proceso se repitió dos veces); finalmente la mezcla solvente con PHA se colocó en vaso de precipitados de vidrio (10 mL) en donde el solvente fue separado por evaporación a 85 °C. El pellet de PHA adherido a las paredes del contenedor se recuperó adicionando etanol frío, el etanol residual fue eliminado por evaporación y se determinó el rendimiento de PHA. Las muestras de PHA se resguardaron para su caracterización fisicoquímica.

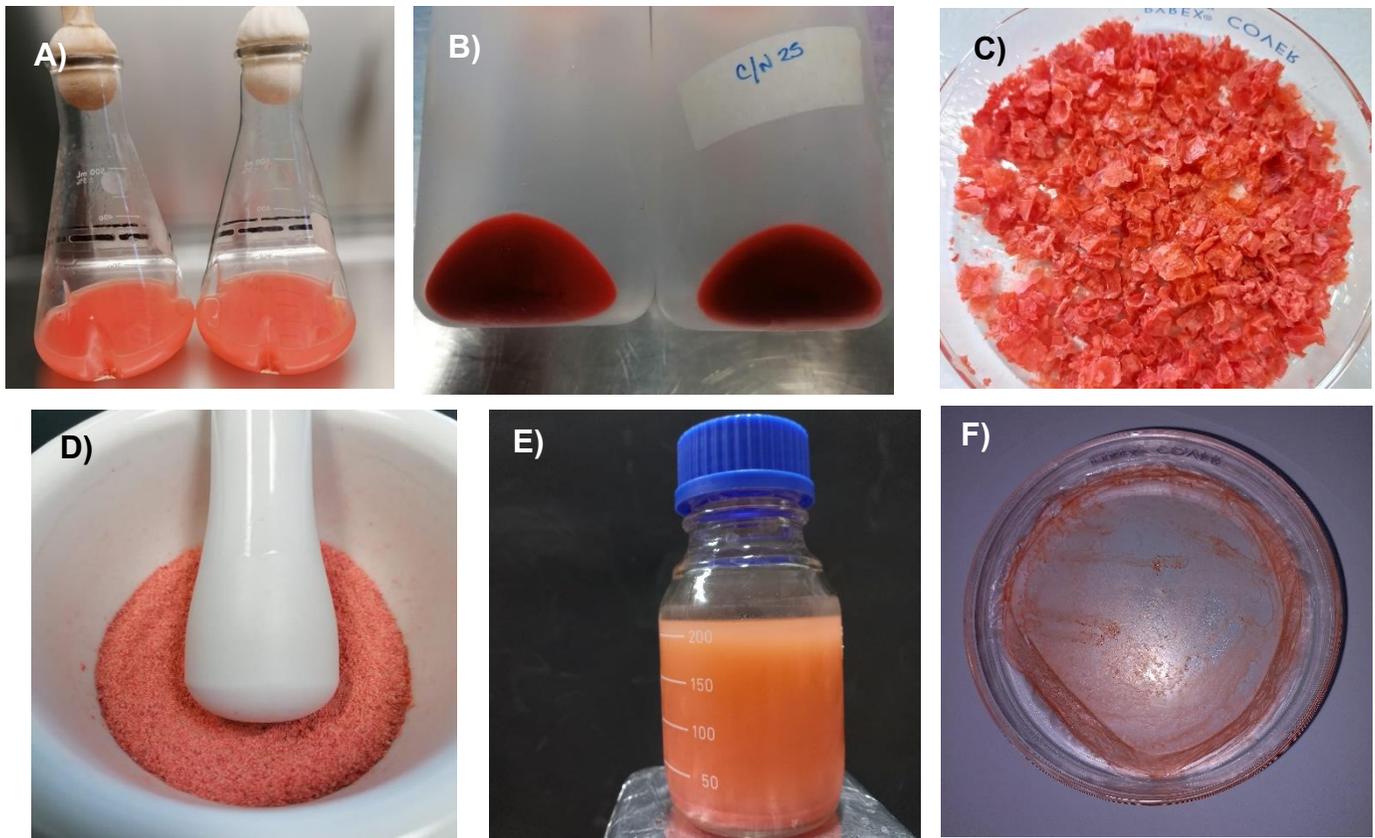


Figura 3-3. Fotografías representativas del proceso de producción y recuperación del PHA. A) *Haloferax mucosum* creciendo en medio líquido ATCC 2185 (NaCl, 4M); B) Separación de la biomasa del caldo de fermentación; C) Biomasa seca; D) Biomasa pulverizada; E) Biomasa resuspendida en cloroformo; F) Recuperación del PHA.

La acumulación de PHA fue determinada con la [Ecuación \(5\)](#), dónde $m_{\text{PHA seco}}$ es la masa de PHA seco recuperado en cualquier tiempo de fermentación y X es la masa de células secas.

$$PHA_{\text{acumulación}} = \frac{m_{\text{PHA seco}}}{X} \times 100 \quad \text{Ec. (5)}$$

3.3.4 ANÁLISIS QUÍMICO DEL POLIHIDROXIALCANOATO (PHA) PRODUCIDO POR *Haloferax mucosum*.

Los PHA sintetizados por *Haloferax mucosum* que creció en medio ATCC 2185 modificado (NaCl 2.5 M y relación C/N= 35) ([ver Capítulo 2](#)) y los PHA producidos en medio ATCC 2185 (NaCl 4 M y relación C/N= 48) fueron denominados PHA₁ y

PHA₂ respectivamente. La caracterización química y térmica de ambos biopolímeros se realizó como se describe a continuación.

3.3.4.1 Composición de grupos funcionales

La muestra purificada y seca de PHA se analizó con un espectrómetro Agilent Cary 630 por ATR-TFIR, tomando los rangos espectrales de 4000 – 400 cm⁻¹ interpretando la presencia específica de sus grupos funcionales. Los espectros del PHA purificado fueron comparados con PHB comercial (GoodFellow).

3.3.4.2 Identificación monomérica

Para el análisis de los monómeros contenidos en el PHA sintetizado por *Haloferax mucosum*, se utilizó la técnica de separación de Cromatografía de Gases (GC) siguiendo la metodología de [Pérez-Arauz et al., \(2019\)](#). En primer lugar, se derivatizaron los ésteres metílicos de ácidos grasos mediante propanólisis. Se llevó a cabo la digestión de 0.010 g de PHA a 100 °C durante 4 h en una solución que contenía propanol:HCl (80:20 v/v, 1 mL), cloroformo (2 mL) y ácido benzoico (200 µL). Luego, se agregaron 2 mL de agua destilada, y finalmente la fase orgánica se recuperó después de la precipitación. Para el análisis de las muestras se utilizó un sistema de CG (SRI 8610C Gas Chromatograph, USA), con columna empacada Chromosorb (25 m de largo, 0.25 mm de diámetro y 0.2 µm de espesor) mantenida a 170 °C en programa isotérmico, (Alltech, Deerfield, IL, E.U.A.). Se utilizó nitrógeno como gas portador a un caudal de 3 mL/min. Las muestras se inyectaron (0.002 mL) utilizando el método de inyección con jeringa.

3.3.4.3 Determinación de la masa molar de PHA

La masa molar del PHA se estimó por cromatografía de exclusión por tamaño de alta resolución (HPSEC) con un sistema HPLC Agilent 1260 Infinity (Agilent Technologies® Inc., E.U.A.) conectado a un detector de índice de refracción (RID) y equipado con dos columnas PLgel Mixed-B (300 × 7,5 mm, 10 µm). Para la calibración se utilizaron patrones de poliestireno monodisperso

(EasiCal PS-1, Agilent). Se utilizó cloroformo grado HPLC (Marca Fermont®) como fase móvil a un flujo sostenido de 1.0 mL/min y cada muestra se inyectó a un volumen de 10 μ L. Tanto el termostato de la columna como la temperatura del detector se estabilizaron a 35 °C. Las muestras se procesaron por triplicado y se analizaron utilizando el software de análisis de datos GPC/SEC (Agilent Technologies®, Inc.). Para la estimación de la masa molar del PHA se preparó una curva de calibración usando tiras estándar de poliestireno (EasyVial Standars, Agilent Technologies) y la preparación se realizó de acuerdo con la metodología del fabricante.

3.3.5 PROPIEDADES TÉRMICAS DEL PHA

Las propiedades térmicas del PHA producido por *Haloferax mucosum* se determinaron mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC), para obtener la temperatura de fusión (T_m), entalpía de fusión (ΔH_m) y temperatura de transición vítrea (T_g). Las mediciones de DSC se realizaron utilizando la metodología descrita por [Pramanik et al., \(2012\)](#) utilizando un calorímetro DSC 2500 Discovery (TA Instruments, New Castle, DE, E.U.A.) en un rango de temperatura de 0 a 250 °C a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min, en una atmósfera de nitrógeno de 50 cm³/min.

3.3.5.1 Porcentaje de cristalinidad de los PHA obtenidos.

Para determinar el grado de cristalinidad de ambos PHA, se utilizó la Ecuación (6) ([Yasin & Al-Mayaly, 2021](#)):

$$X_p = \frac{\Delta H_m}{W_p * \Delta H_m^0} * 100 \quad \text{Ec. (6)}$$

En donde:

X_p = Cristalinidad del polímero (%)

ΔH_m = Cambio de entalpía durante el proceso de fusión del polímero (Jg⁻¹)

W_p = Porción del polímero cuando es una mezcla polimérica (fracción masa)

ΔH_m° = Cambio de entalpía del proceso de fusión de un PHB 100% cristalino.

Se tomó como referencia la ΔH_m° reportada por [López-Cuellar, Alba-Flores, Rodríguez, and Pérez-Guevara \(2011\)](#) el cual es de 146 J g⁻¹.

3.4 RESULTADOS Y DISCUSIONES

CRECIMIENTO DE *Haloferax mucosum* Y SÍNTESIS DE PHA

Existen reportes relacionados a una mejor producción de PHA, cuando las concentraciones salinas aumentan (entre 20-25%) y la cantidad de nitrógeno es limitada (Nicolaus et al., 1999; Pramanik et al., 2012; Tan, Xue, Aibaidula, & Chen, 2011). Para *Haloferax mucosum* también fue el caso, posterior a la cinética de coproducción (Capítulo 2), se realizó una modificación en el medio de cultivo ATCC 2185 (4M NaCl, C/N ~50) para observar la producción de PHA, teniendo resultados en la producción del bioplástico. En esta cinética se reporta la biosíntesis de PHA por gramo de biomasa residual (X_r), siendo $0.13 \text{ g}_{\text{PHA}}/\text{g}_{\text{X}_r}$ la producción general hasta las 96 h de fermentación, la cual es mayor a lo obtenido en el Capítulo 2 ($0.05 \text{ g}_{\text{PHA}}/\text{g}_{\text{Biomasa}}$), con esto se confirma que el aumento en la concentración de NaCl y la disminución de la fuente de nitrógeno mejoran la producción de PHA, es importante mencionar que en esta cinética no hubo biosíntesis del exopolisacárido. En la Figura 3-4, se observa la relación entre el crecimiento microbiano y el consumo de glucosa (30 g/L).

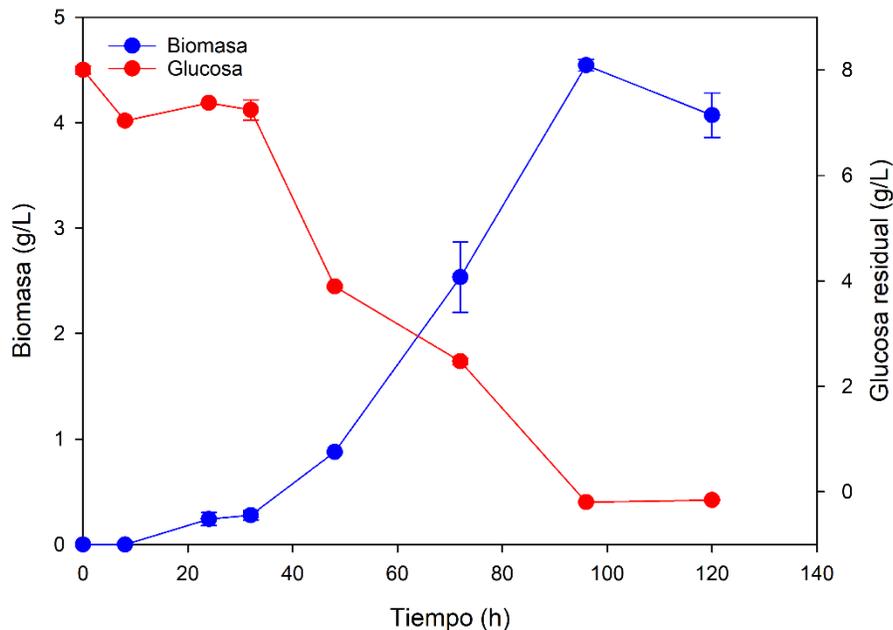


Figura 3-4. Relación entre el crecimiento celular y el consumo de glucosa para *Haloferax mucosum*, cuando crece en medio modificado (ATCC 2185, NaCl 4 M, C/N= 48)

La tasa máxima de crecimiento específico (μ_{\max}) en este medio de producción fue de 0.180 h^{-1} y el consumo máximo de fuente de carbono por gramo de biomasa residual de $12.20 \text{ g}_{\text{sustrato}} \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ X}$, los valores obtenidos son mayores a los obtenidos en el [Capítulo 2](#), de igual manera, es mayor a lo reportada ([López-Ortega et al., 2020](#)) para *Haloferax mucosum* (0.029 h^{-1}), creciendo bajo una relación C/N limitada (~ 9) en concentración de NaCl 2 M y agitación en matraces no bafleados; y mayor al resultado reportado para *Haloferax mediterranei* crecida en una relación C/N=65 (0.06 h^{-1}) ([Cui, Shi, et al., 2017](#)); superior para *Haloferax* sp. MNSC14 que creció con heptadecano, fenantreno y acetato de amonio, con valores de μ_{\max} de 0.026 , 0.018 y 0.038 h^{-1} , respectivamente ([Djeridi, Militon, Grossi, & Cuny, 2013](#)). Por otro lado, en la [Figura 3-5](#), se hacen las representaciones gráficas del mismo.

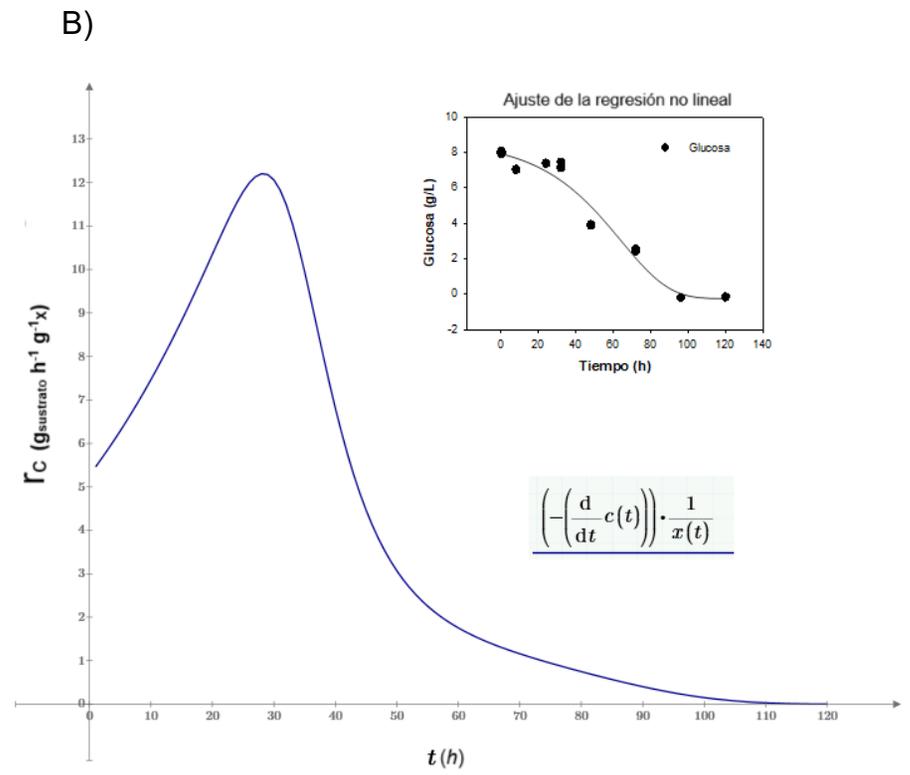
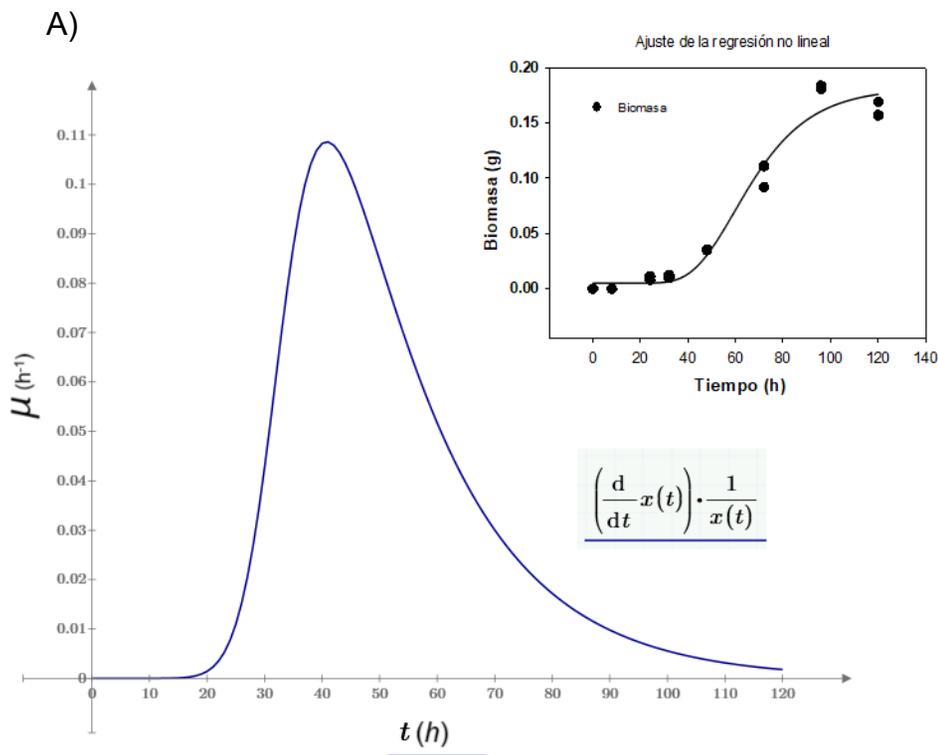


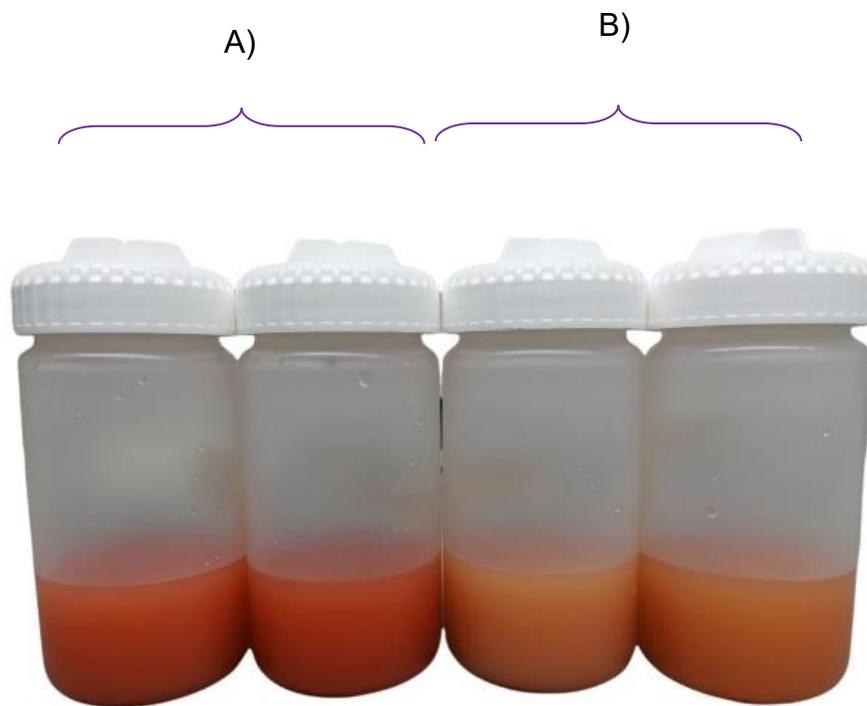
Figura 3-5. Gráficos obtenidos de la fermentación de *Haloferax mucosum* en medio ATCC 2185 (4 M, C/N= 48). A) velocidad específica de crecimiento (μ); B) velocidad específica de consumo de glucosa (r_C).

La acumulación de PHA, podría deberse al incremento de salinidad. Diferentes autores han explicado que a medida que incrementa la salinidad el microorganismo entra en estrés, lo cual activa las vías de acumulación de las reservas de carbono (Obruca et al., 2021). También, recientemente, se ha reportado que algunos microorganismos aerobios pueden adaptarse a hipoxia (falta de oxígeno disponible) por el desvío del carbono orgánico durante la fermentación hacia rutas metabólicas de síntesis y acumulación de glicéridos como reserva de carbono (Gillett et al., 2023). La concentración de O_2 disuelto en agua depende de la salinidad y de la temperatura. En sistemas altamente salinos, como los empleados para el crecimiento de *Haloferax mucosum*, y en temperatura de incubación de 37 °C, la solubilidad del oxígeno en agua disminuye drásticamente; en el medio que contiene ~150 g/L de NaCl (Medio 1) la disponibilidad inicial de O_2 es de 0.31 mg_{O_2}/L , mientras que en el medio ~240 g/L de NaCl (Medio 2) la solubilidad es de 0.2 mg_{O_2}/L (Colt, 1984). Por lo anterior, en el medio 2.5 M el perfil cinético de *Haloferax mucosum* indicó que ésta inició la fase logarítmica de crecimiento desde las 24 h, mientras que en el medio 4 M el crecimiento celular fue más lento, comenzando a las 32 h y tuvo un crecimiento exponencial a partir de las 48 h.

Es una posibilidad que la vía de producción de polisacárido no se active debido a que la producción de EPS requiere de una mayor demanda energética, y aunado a la baja disponibilidad de oxígeno y de nitrógeno, las rutas biosintéticas prioricen en el crecimiento celular y vías de reserva de almacenamiento a través del metabolismo secundario.

El desvío de las rutas metabólicas de las arqueas halófilas es muy poco estudiado, sin embargo, existen teorías relacionadas a la inhibición de la producción de EPS en altas concentraciones de NaCl. Cuando existe una mayor concentración de NaCl en el medio, los nutrientes y el agua se encuentran poco disponible para las células microbianas. La ruta metabólica del EPS, es más compleja que la del PHA, lo que conlleva a un mayor desgaste energético para la célula, el cual no posee cuando la disponibilidad su fuente de energía es baja, por ello se desvía a una ruta más corta (PHA) inhibiendo así la producción del exopolisacárido.

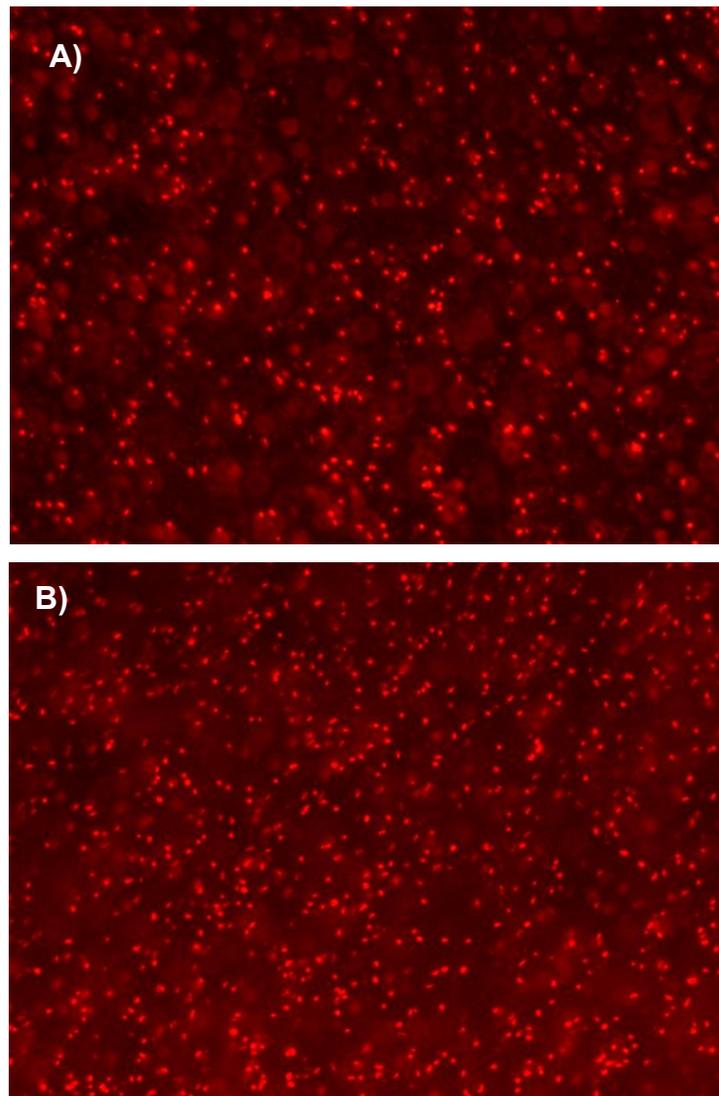
Otra teoría, aunada a la anterior, es el estrés osmótico que enfrenta el microorganismo, este estrés puede apreciarse con los pigmentos producidos por las arqueas, una mayor pigmentación indica que el estrés por la concentración (alta o baja) de sal es alta y que las células están luchando por regularla y sobrevivir coproduciendo ambos biopolímeros (concentración de NaCl 2.5 M), a diferencia de una pigmentación leve, la cual indica que el microorganismo no está en un estrés osmótico muy alto por ello la ruta metabólica se redirige a la producción de PHA y pigmentos [Figura 3-6 \(Cui, Gong, et al., 2017\)](#).



[Figura 3-6](#). Caldo de la fermentación de *Haloferax mucosum* cuando crece en concentraciones de NaCl de: A) 2.5 M y B) 4 M.

3.4.1 MICROGRAFÍA FLUORESCENTE DE LAS CÉLULAS DE *Haloferax mucosum* CRECIENDO EN MEDIO DE CULTIVO CON NaCl 4 M.

En la [Figura 3-7](#) podemos observar las micrografías tomadas de las células recuperadas del caldo de fermentación a las 48 y 96 h crecidas en medio de cultivo que contenía 4 M de NaCl, teñidas con Rojo Nilo y vistas bajo microscopio de contraste de fases con aumento de 400×.



[Figura 3-7](#). Microscopía de fluorescencia con contraste verde de las células no fijadas y teñidas con Rojo Nilo durante la producción de PHA en medio de cultivo ATCC2185 con NaCl (4 M) y relación de C/N 48, a los: A) 48 h y B) 96 h.

3.4.2 ESPECTROMETRÍA INFRARROJA CON TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR) DEL PHA RECUPERADO.

Los PHA producidos y recuperados de *Haloferax mucosum* fueron analizado por FTIR para identificar sus principales grupos funcionales (Tabla 3-2), utilizando como estándar el PHB estándar (LS323696). En los espectros de los PHA producidos por *Haloferax mucosum* se pueden observar la banda principal en el intervalo de los 4000–650 cm^{-1} (Figura 3-8). Los picos en las regiones 3100 y 2700 cm^{-1} que corresponden al estiramiento asimétrico, antisimétrico y simétrico de CH_3 , CH_2 y CH_3 , respectivamente, esta banda es más intensa en los PHB y está relacionada con la presencia de regiones cristalinas, a mayor intensidad de los picos, más incrementa esta región (López-Cuellar et al., 2011).

De igual manera, se observan picos intensos a los 1720 y 1021 cm^{-1} , el primer pico representa un marcador para la identificación de PHA, y denota el estiramiento del éster carbonilo, y está asociado también con la región cristalina del poliéster (Pérez-Arauz et al., 2019; Tohme et al., 2018); por otro lado, la banda en 1278 cm^{-1} y 1281 cm^{-1} representan el estiramiento C–O–C. Los picos registrados en 1455 y 1380 cm^{-1} corresponden a las vibraciones del estiramiento asimétrico y simétrico del grupo metilo C–H. En los picos de 1227 cm^{-1} encontramos las vibraciones del grupo éster cristalino ordenados, mientras que a los 1180 cm^{-1} están los dominios amorfos. Basado en lo anterior, el bioplástico muestra un perfil característico de poliéster de PHA ya que sus comparten gran similitud con el PHB estándar comparado en los espectros.

Tabla 3-2. Principales grupos funcionales encontrados en el PHA producido por *Haloferax mucosum*.

Grupo químico	Número de onda (cm^{-1})
-CH ₂ -	2925
-CH ₃ -	2980
O-C=O	1720
-C-O-C	1300– 1000
C-O-C	1181, 976
C-O-C, C-C y flexión C-O-H	1056
C-C-H, C-O-C	861

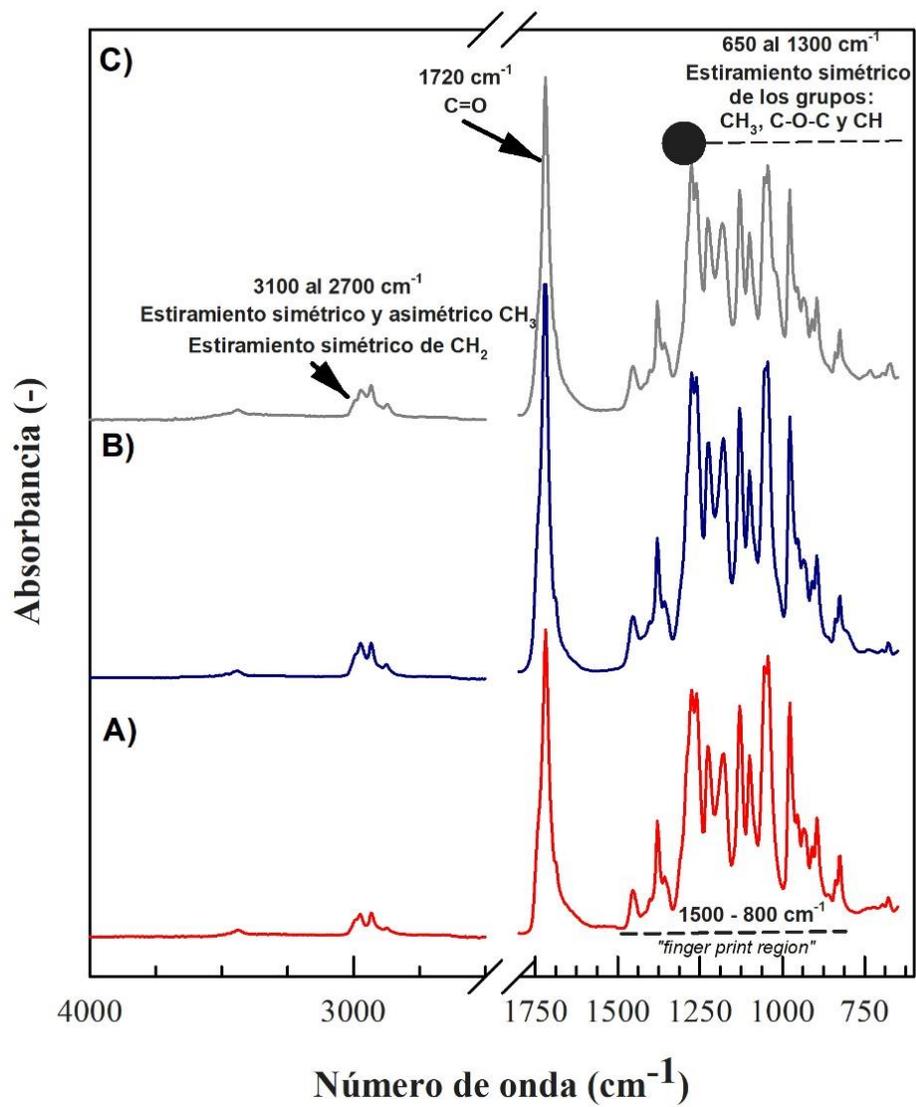


Figura 3-8. Espectro FT-IR de PHA producido por *Haloferax mucosum* en medio ATCC 2185 modificado A) NaCl 2.5 M, C/N=35, B) NaCl 4 M, C/N=48 y C) PHBV estándar.

3.4.3 COMPOSICIÓN MONOMÉRICA DEL PHA PRODUCIDO POR *Haloferax mucosum*.

Los PHA producidos en 2.5 M y 4 M de NaCl mostraron diferencia en su estructura química, y se diferenciaron como PHA₁ y PHA₂, respectivamente.

De acuerdo a la identificación monomérica de los PHA obtenidos se llegó a la conclusión que *Haloferax mucosum* produce un copolímero, poly(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato), las condiciones tienen un efecto en la composición monomérica, a medida que incrementa la fuerza iónica en el medio de cultivo el contenido de hidroxivalerato incrementa 3.7 veces. En la [Tabla 3-3](#), se presentan los datos obtenidos en porcentaje de estos monómeros.

Tabla 3-3. Porcentaje masa de PHB y PHV en el biopolímero producido por *Haloferax mucosum* en las dos condiciones de fermentación (2.5 y 4 M). Los datos presentados son el promedio de 6 réplicas*.

PHA ₁		PHA ₂	
PHB	PHV	PHB	PHV
99.16%	0.38%	98.58%	1.4%

Podemos observar que, aunque en ambas condiciones de crecimiento (2.5 y 4 M NaCl) se produce el mismo copolímero, este se encuentra en diferente proporción; el PHA₁ tiene mayor porcentaje del monómero HB que el PHA₂, esto puede deberse a esa diferencia en la concentración de NaCl, el tiempo de fermentación, en la relación C/N, entre otros factores. Todas estas diferencias provocan los cambios en las estructuras de los PHA.

El polihidroxi-butirato (PHB) es el PHA más sintetizado por los microorganismos, este está conformado únicamente por monómeros de 3-hidroxi-butirato, aunque, este monómero por sí solo no tiene tanta implementación en la industria debido a su alta cristalinidad.

La arquea halófila *Halogeometricum borinquense* E3, es capaz de producir el copolímero P(3HB-co-3HV) con un 21.47% de 3-HV (Salgaonkar & Braganca, 2015), por otro lado, *H. mediterranei* también sintetiza PHBV en proporciones de 18.21% and 24.85% (Lu et al., 2008).

3.4.4 MASA MOLAR

La masa molar (M_w) obtenida por HPLC-SEC de los polihidroxicanoatos producido por *Haloferax mucosum* en ambas concentraciones de NaCl, se describen en la Tabla 3-4 así como la comparación de estas con otros PHA producidos por otras arqueas halófilas. La fuente de carbono con la que se alimenta el medio de cultivo influye en la masa molecular del PHA (Simo-Cabrera et al., 2021).

Tabla 3-4. Peso molecular promedio en peso (M_w), Masa molar numérica (M_n) y el Índice de polidispersidad ($PDI = M_w/M_n$) de los PHA producidos por *Haloferax mucosum* en las dos concentraciones de NaCl 2.5 M (PHA₁) y 4 M (PHA₂), así como dos comparaciones con otras arqueas halófilas. Los resultados presentados son el promedio de 3 réplicas*.

<i>Haloferax mucosum</i> PHA ₁	<i>Haloferax mucosum</i> PHA ₂	<i>Halogeometricum borinquense</i> E3	<i>Haloferax mediterranei</i>
M_w : 232.87 kDa	M_w : 605.51 kDa	M_w : 288,723 Da	M_w : 811 kDa
M_n : 113.42 kDa	M_n : 597.52 kDa	M_n : 156,899 Da	M_n : 504 kDa
PDI: 1.9	PDI: 4.3	PDI: 1.8	PDI: 1.6
Presente estudio	Presente estudio	(Mahansaria et al., 2020)	(Ghosh et al., 2022)

3.4.5 CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO

Una vez obtenido los PHA de ambas fermentaciones, se llevó a cabo el análisis de calorimetría diferencial de barrido para obtener las temperaturas de fusión (T_m) para cada uno y se comparó con un estándar de PHB. Al tener diferencia entre la composición monomérica y la masa molar de estos bioplásticos, se infirió en que la T_m también sería diferente entre ellas.

El análisis de DSC muestra que, el copolímero con el contenido más alto de 3HV, muestra un comportamiento diferente con el PHA que tiene menor porcentaje del mismo homopolímero en su estructura, en la [Tabla 3-5](#) se resumen los resultados obtenidos y se comparan con el de algunas otras arqueas halófilas reportadas. El valor de la temperatura de fusión para el PHA producido en la cinética de 2.5 M fue de 167.98 °C con una ΔH_m de 75.268 J g⁻¹.

El PHA producido con mayor concentración de NaCl, se observan dos temperaturas de fusión, 163.48°C y 170.86°C y una entalpía de ΔH_m 89.609 J g⁻¹, ambos picos de fusión pueden deberse a varios factores, (a) composición monomérica, (b) cristalización, (c) especies de diferente peso molecular, (d) efectos de orientación, entre otras. Es difícil poder discriminar entre los efectos causales la razón de ambos picos. Aunque, de acuerdo a su estructura, puede deberse a la alta cristalización que este presenta en este PHA obtenido a diferencia del PHA producido con 2.5 M de NaCl; y también puede deberse al diferente punto de fusión de cada monómero, el PHA obtenido del 4 M de NaCl tiene un mayor porcentaje de PHV, el cual tiene una menor temperatura de fusión que el PHB.

En la [Figura 3-9](#), podemos observar los termogramas obtenidos de la técnica de DSC de los tres biopolímeros analizados.

La incorporación de pequeños porcentajes de unidades monoméricas en la cadena del PHA afecta significativamente a la temperatura de fusión ([López-Cuellar et al., 2011](#)), como se pueden observar en las T_m ([Ver Figura 3-9](#)) de los copolímeros producidos por *Haloferax mucosum*, en donde ésta es menor al del estándar estudiado.

El porcentaje de cristalización determinado a partir de la [Ecuación 3](#) fue de 49.36% para el PHA₁ y 56.98% para el PHA₂. De acuerdo a la literatura, el PHB, por sí sólo es de alto grado de cristalinidad, siendo un material fuerte pero rígido, esto puede cambiar cuando se le incorporan monoméricos de HV, reduciendo la cristalinidad y contribuyen al aumento de la resistencia, flexibilidad, elasticidad y reducen los valores de T_m y T_g , esto gracias a su ramificación ([Kalia, 2016](#)).

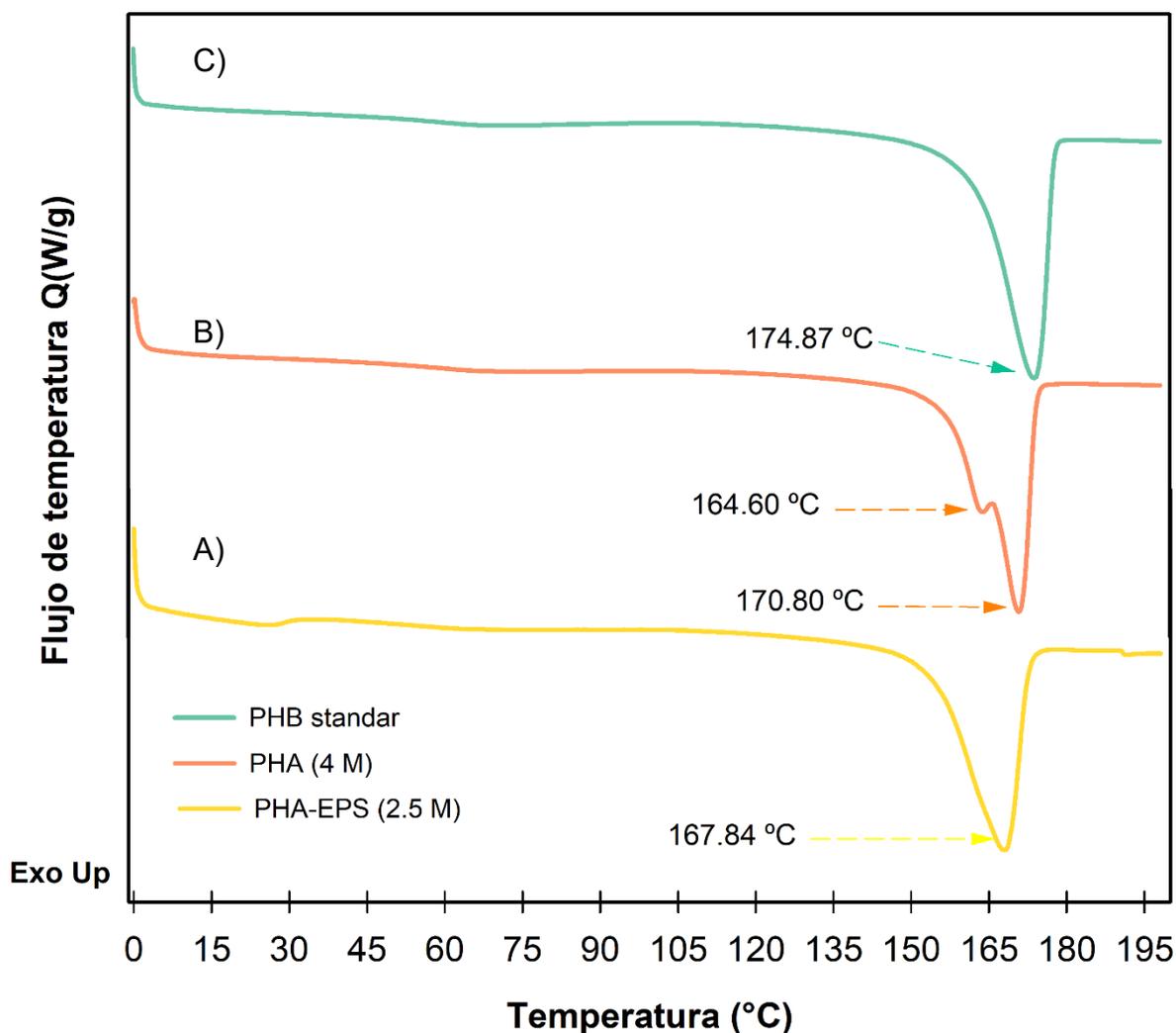


Figura 3-9. Termogramas obtenidos por DCS de los PHA producidos por *Haloferax mucosum* en concentraciones de NaCl de: A) 2.5 M, B) 4 M, y C) PHB estándar.

Tabla 3-5. Comparación de las propiedades térmicas del P(HB-co-HV) producido por algunas arqueas halófilas.

Arquea halófila productora de PHA	PHA	3HV (%)	T_{f_1} (°C)	T_{f_2} (°C)	ΔH_{m_1} (J g ⁻¹)	T_g (°C)	X_c (%)	Referencia
<i>Haloferax mediterranei</i> (ATCC 33500)	P(3HB-co-3HV)	NR	177.1	-	NR	NR	NR	Ghosh et al., (2022)
<i>Haloferax mediterranei</i> (ATCC 33500)	P(3HB-co-3HV)	10.3	134.8	144.3	44.67	NR	NR 37% (estimado)	Don, Chen & Chan (2006)
<i>Halogeometricum borinquense</i> E3	P(3HB-co-3HV)	21.47	138	154.5	NR	NR	NR	Salgaonkar & Bragança (2015)
<i>Halogeometricum borinquense</i> RM-G1	P(3HB-co-3HV)	10.21	139.1	152.5	NR	-12.6	NR	Mahansaria et al., (2020)
PHB standard (<i>Goodfellow</i>)	PHB	12	-	174.87±0.27	88.27±0.18	57.62	66.78±0.56	Este trabajo
<i>Haloferax mucosum</i> (DSM 27191)	PHA ₁	0.38		167.84±0.13	71.46±4.56	54.69	49.36±3.15	Este trabajo
	PHA ₂	1.4	164.60±1.59	170.80±0.78	84.39±4.52	57.83	56.98±3.05	Este trabajo

PHA₁: Condiciones de producción: ATCC2185 medio modificado (NaCl 2.5 M, E.L. 6 g/L, C/N=35); PHA₂: condiciones de producción: ATCC2185 medio modificado (NaCl 4 M, E.L. 3 g/L, C/N=50); E.L. extracto de levadura; NR: no reportado;

3.5 CONCLUSIONES

La arquea halófila *Haloferax mucosum* es capaz de co-producir PHA en medio de cultivo modificado NaCl 2.5 M y C/N= 35 e inhibir la producción de EPS cuando esta crece en concentraciones de NaCl 4 M y relación C/N= 48, dirigiendo por completo la fuente de carbono en la producción de PHA. Con el segundo medio de cultivo modificado (NaCl 4 M y C/N=48) se obtuvieron mejores rendimientos de PHA, siendo 0.13 g_{PHA}/g_{X_r} la producción general hasta las 96 h de fermentación, la cual es mayor a lo obtenido en la coproducción, ya que el rendimiento de PHA fue de 0.011 g_{PHA}/g_{Biomasa} a las 144 h de fermentación.

A continuación, se diferenciarán ambos PHA producidos, siendo PHA₁ el producido en concentraciones de NaCl 2.5 M y relación C/N= 35 y PHA₂ aquel que se obtuvo en concentraciones de NaCl 4 M y C/N= 48.

Los PHA producidos por *Haloferax mucosum* son de alto peso molecular (PHA₁= 232.87 kDa y PHA₂= 605.51 kDa), ambos son copolímeros de poly(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato) ya que presentan monómeros de HB y HV en su estructura, aunque en diferentes proporciones, el PHA₁ tiene un porcentaje del 99.16% de HB y 0.38% de HV, mientras que el PHA₂ un 98.58% de HB y un 1.4% de HV. Ambos PHA son termoplásticos, aunque debido a la diferencia en su composición monomérica, también presentan diferencia en sus propiedades térmicas; el PHA₁ tiene una temperatura de fusión (T_m) a los 167.84±0.13 °C, una entalpía de fusión (ΔH_{m_1}) de 71.46±4.56 J g⁻¹ y temperatura de transición vítrea (T_g) de 54.69 °C, el PHA₂ presenta dos T_m , la primera a los 164.60±1.59 °C correspondiente al monómero de PHV y otra a los 170.80±0.78 °C correspondiente al monómero de PHB, por otro lado, su ΔH_{m_1} (84.39±4.52 J g⁻¹) y su T_g (57.83) es superior al PHA₁. También presentan diferencia en la cristalinidad, el PHA₂ es más cristalino (56.98%) en comparación al PHA₁ (49.36%).

3.6 BIBLIOGRAFÍA

- Anjum, A., Zuber, M., Zia, K., Noreen, A., Anjum, M., & Tabasum, S. (2016). Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. *International journal of biological macromolecules*, 89, 161-174.
- Bhattacharyya, A., Pramanik, A., Maji, S. K., Haldar, S., Mukhopadhyay, U. K., & Mukherjee, J. J. A. e. (2012). Utilization of vinasse for production of poly-3-(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) by *Haloferax mediterranei*. *AMB express*, 2(1), 1-10.
- Bugnicourt, E., Cinelli, P., Lazzeri, A., & Alvarez, V. A. (2014). Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging.
- Colt, J. (1984). Computation of Dissolved Gas Concentrations in Water as Functions of Temperature, Salinity and Pressure. American Fisheries Society Special Publication 14.
- Cui, Y.-W., Gong, X.-Y., Shi, Y.-P., & Wang, Z. D. (2017). Salinity effect on production of PHA and EPS by *Haloferax mediterranei*. *RSC Advances*, 7(84), 53587-53595.
- Cui, Y.-W., Shi, Y.-P., & Gong, X.-Y. (2017). Effects of C/N in the substrate on the simultaneous production of polyhydroxyalkanoates and extracellular polymeric substances by *Haloferax mediterranei* via kinetic model analysis. *RSC Advances*, 7(31), 18953-18961. doi:10.1039/c7ra02131c
- Cui, Y.-W., Zhang, H.-Y., Ji, S.-Y., & Wang, Z.-W. (2017). Kinetic analysis of the temperature effect on polyhydroxyalkanoate production by *Haloferax mediterranei* in synthetic molasses wastewater. *Journal of Polymers the Environment*, 25, 277-285.
- Djeridi, I., Militon, C., Grossi, V., & Cuny, P. (2013). Evidence for surfactant production by the haloarchaeon *Haloferax* sp. MSNC14 in hydrocarbon-containing media. *Extremophiles*, 17(4), 669-675. doi:10.1007/s00792-013-0550-8
- Don, T.-M., Chen, C. W., & Chan, T.-H. (2006). Preparation and characterization of poly (hydroxyalkanoate) from the fermentation of *Haloferax mediterranei*. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 17(12), 1425-1438.
- Federle, T. W., Barlaz, M. A., Pettigrew, C. A., Kerr, K. M., Kemper, J. J., Nuck, B. A., & Schechtman, L. A. (2002). Anaerobic biodegradation of aliphatic polyesters: poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyoctanoate) and poly (ϵ -caprolactone). *Biomacromolecules*, 3(4), 813-822.
- Ferre-Guell, A., & Winterburn, J. (2017). Production of the copolymer poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) with varied composition using different nitrogen sources with *Haloferax mediterranei*. *Extremophiles*, 21(6), 1037-1047.
- Ghosh, S., Coons, J., Yeager, C., Halley, P., Chemodanov, A., Belgorodsky, B., . . . Golberg, A. (2022). Halophyte biorefinery for polyhydroxyalkanoates production from *Ulva* sp. Hydrolysate with *Haloferax mediterranei* in

- pneumatically agitated bioreactors and ultrasound harvesting. *Bioresource Technology*, 344, 125964.
- Ghosh, S., Gnaim, R., Greiserman, S., Fadeev, L., Gozin, M., & Golberg, A. (2019). Macroalgal biomass subcritical hydrolysates for the production of polyhydroxyalkanoate (PHA) by *Haloferax mediterranei*. *Bioresource technology*, 271, 166-173. doi:10.1016/j.biortech.2018.09.108
- Giin-Yu, A. T., Chia-Lung, C., Ling, L., Liya, G., & Lin, W. J. P. (2014). Start a research on biopolymer polyhydroxybutyrate (PHB). *Polymers*, 6, 706-754.
- Gillett, D. L., Hutchinson, T., Mudaliyar, M., Watts, T. D., Wong, W. W., Locop, J., . . . Tanuwidjaya, E. (2023). An obligate aerobe adapts to hypoxia by hybridising fermentation with carbon storage. *bioRxiv*, 2023.2009. 2011.557286.
- Kalia, V. J. D. (2016). Microbial factories biodiversity, biopolymers, bioactive molecules: Volumen 2. 10, 978-981.
- Koller. (2015). Study on the Production and Re-use of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and Extracellular Polysaccharide by the Archaeon *Haloferax mediterranei* Strain DSM 1411. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 29(2), 87-98. doi:10.15255/cabeq.2014.2058
- Koller, M. (2019). Polyhydroxyalkanoate biosynthesis at the edge of water activity: haloarchaea as biopolyester factories. *Bioengineering*, 6(2), 34.
- Kumar, M., Rathour, R., Singh, R., Sun, Y., Pandey, A., Gnansounou, E., . . . Thakur, I. S. (2020). Bacterial polyhydroxyalkanoates: Opportunities, challenges, and prospects. *Journal of Cleaner Production*, 263, 121500.
- Laycock, B., Halley, P., Pratt, S., Werker, A., & Lant, P. (2013). The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates. *Progress in polymer science*, 38(3-4), 536-583.
- López-Cuellar, M. R., Alba-Flores, J., Rodríguez, J. N., & Pérez-Guevara, F. (2011). Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) with canola oil as carbon source. *International journal of biological macromolecules*, 48(1), 74-80. doi:10.1016/j.ijbiomac.2010.09.016
- López-Ortega, M. A., Rodríguez-Hernández, A. I., Camacho-Ruiz, R. M., Córdova, J., López-Cuellar, M. D. R., Chavarría-Hernández, N., & González-García, Y. (2020). Physicochemical characterization and emulsifying properties of a novel exopolysaccharide produced by haloarchaeon *Haloferax mucosum*. *International journal of biological macromolecules*, 142, 152-162. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.09.087
- Lu, Q., Han, J., Zhou, L., Zhou, J., & Xiang, H. (2008). Genetic and biochemical characterization of the poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) synthase in *Haloferax mediterranei*. *Journal of bacteriology*, 190(12), 4173-4180. doi:10.1128/JB.00134-08
- Mahansaria, R., Bhowmik, S., Dhara, A., Saha, A., Mandal, M. K., Ghosh, R., & Mukherjee, J. (2020). Production enhancement of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in *Halogeometricum borinquense*, characterization of the bioplastic and desalination of the bioreactor effluent. *Process Biochemistry*, 94, 243-257. doi:10.1016/j.procbio.2020.04.004
- Miller, G. (1959). Modified DNS method for reducing sugars. *Analytical chemistry*, 31(3), 426-428.

- Nicolaus, Lama, L., Esposito, E., & Manca, M. C. (1999). *Haloarcula* spp able to biosynthesize exo- and endopolymers. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 23, 489-496.
- Noda, I., Lindsey, S. B., & Caraway, D. (2009). Nodax™ class PHA copolymers: their properties and applications. In *Plastics from bacteria: natural functions and applications* (pp. 237-255): Springer.
- Obruca, S., Sedlacek, P., & Koller, M. (2021). The underexplored role of diverse stress factors in microbial biopolymer synthesis. *Bioresource Technology Reports*, 326, 124767.
- Pérez-Arauz, A., Aguilar-Rabiela, A., Vargas-Torres, A., Rodríguez-Hernández, A.-I., Chavarría-Hernández, N., Vergara-Porras, B., & López-Cuellar, M. (2019). Production and characterization of biodegradable films of a novel polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesized from peanut oil. *Food Packaging Shelf Life*, 20, 100297.
- Poltronieri, P., & Kumar, P. (2017). Polyhydroxyalkanoates (PHAs) in industrial applications. *Handbook of ecomaterials*, 4, 2843-2872.
- Pramanik, A., Mitra, A., Arumugam, M., Bhattacharyya, A., Sadhukhan, S., Ray, A., . . . Mukherjee, J. (2012). Utilization of vinasse for the production of polyhydroxybutyrate by *Haloarcula marismortui*. *Folia Microbiologica*, 57(1), 71-79. doi:10.1007/s12223-011-0092-3
- Salgaonkar, B. B., & Braganca, J. M. (2015). Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Halogeometricum borinquense* strain E3. *International journal of biological macromolecules*, 78, 339-346. doi:10.1016/j.ijbiomac.2015.04.016
- Salim, Y. S., Chan, C. H., Sudesh, K., & Gan, S. N. (2014). Thermal Properties of Polyhydroxyalkanoates. *Physical Chemistry of Macromolecules: Macro to Nanoscales*, 441.
- Shrivastav, A., Mishra, S. K., & Mishra, S. (2010). Polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis by *Spirulina subsalsa* from Gujarat coast of India. *International journal of biological macromolecules*, 46(2), 255-260.
- Simo-Cabrera, L., Garcia-Chumillas, S., Hagagy, N., Saddiq, A., Tag, H., Selim, S., . . . Martinez-Espinosa, R. M. (2021). Haloarchaea as Cell Factories to Produce Bioplastics. *Mar Drugs*, 19(3). doi:10.3390/md19030159
- Tan, D., Xue, Y.-S., Aibaidula, G., & Chen, G.-Q. (2011). Unsterile and continuous production of polyhydroxybutyrate by *Halomonas* TD01. *Bioresource Technology Reports*, 102(17), 8130-8136.
- Tohme, S., Haciosmanoglu, G. G., Eroglu, M. S., Kasavi, C., Genc, S., Can, Z. S., & Toksoy Oner, E. (2018). *Halomonas smyrnensis* as a cell factory for co-production of PHB and levan. *International journal of biological macromolecules*, 118(Pt A), 1238-1246. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.06.197
- Yasin, A. R., & Al-Mayaly, I. k. (2021). Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate (PHA) by a newly isolated strain *Bacillus tequilensis* ARY86 using inexpensive carbon source. *Bioresource Technology Reports*, 16. doi:10.1016/j.biteb.2021.100846
- Zhao, Y.-X., Rao, Z.-M., Xue, Y.-F., Gong, P., Ji, Y.-Z., & Ma, Y.-H. (2015). Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production by Haloarchaeon

Halogramum amylolyticum. Applied microbiology biotechnology reports, 99, 7639-7649.

CAPÍTULO 4 PERSPECTIVAS

Los hallazgos en esta investigación son un panorama importante de estudio para la arquea *Haloferax mucosum* y sus biopolímeros acumulados, debido a la importancia que han estado tomando estos últimos años ya que son una alternativa renovable, capaz de entrar y competir con polisacáridos comerciales existentes. Como temas de interés que ayudarían a reforzar esta investigación, se sugiere:

- ❖ Establecer un diseño experimental multifactorial que permita evaluar más relaciones de C/N, así como diversas concentraciones salinas, temperaturas y/o pH para incrementar la producción biopolimérica y determinar el cambio en su composición.
- ❖ Establecer metodologías de extracción para ambos biopolímeros sintetizados.
- ❖ Completar la caracterización química del exopolisacárido, implementando técnicas de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y espectrometría de masas (EM).
- ❖ Escalar la bioproducción a configuraciones de tanque agitado de volúmenes mayores.
- ❖ Completar el perfil termogravimétrico, propiedades mecánicas, perfil monomérico con resonancia magnética nuclear (RMN) y evaluar la biodegradabilidad del PHA obtenido.