

56 2ej



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**OBTENCION Y CONSERVACION DE CEPAS
MUTANTES DE Azotobacter vinelandii PARA
LA OBTENCION INDUSTRIAL DE ALGINATOS**



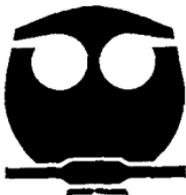
T E S I S

QUE PARA OBTENER EXAMENES PROFESIONALES DE EL TITULO DE FACULTAD DE QUIMICA

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

JULIETA GONZALEZ AGUILAR



MEXICO, D. F.

1990

**TESIS CON
FALSA FE ORIGIN**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

C O N T E N I D O

1. INTRODUCCION	1
2. OBJETIVOS	2
3. GENERALIDADES	3
3.1 <u>Azotobacter vinelandii</u>	
3.2 Alginatos	
3.3 Mutaciones	
4. METODOS	16
4.1 Rehidratación de las cepas	
4.2 Control e identificación de los microorganismos	
4.3 Mutagénesis	
4.4 Liofilización	
4.5 Determinación de viscosidad	
5. RESULTADOS Y DISCUSION	21
5.1 Curvas de crecimiento	
5.2 Mutagénesis con luz U.V.	
5.3 Mutagénesis con EMS	
6. CONCLUSIONES	36
7. BIBLIOGRAFIA	40

OBTENCION Y CONSERVACION DE CEPAS MUTANTES DE
Azotobacter vinelandii PARA LA OBTENCION
INDUSTRIAL DE ALGINATOS

1. INTRODUCCION

La importancia de los alginatos radica en su capacidad para formar geles por lo que tienen una amplia aplicación en las industrias: alimentaria, farmacéutica, cosmética, textil y de papel. La sal de sodio del ácido alginico, es la más utilizada, aunque también lo son las de potasio, amonio y propilenglicol, siendo sus principales aplicaciones como agentes estabilizantes, emulsificantes, gelificantes y de suspensión.

Actualmente los alginatos comerciales son extraídos de algas pardas, principalmente de *Macrosystis pirifera*, *Laminaria digitata*, *Laminaria clostoni*, *Ascophyllum nodosum* y algunas especies de *Fucus*; el contenido de alginato varía de especie a especie y depende también de la estación del año y la localidad en que crecen.

Algunos microorganismos como *Azotobacter vinelandii* (9,16,21), *Pseudomonas aeruginosa* (6,10) y otros producen alginatos extracelularmente, lo que ofrece otras alternativas para la obtención de dicho polímero.

2. OBJETIVOS

- Obtener cepas de Azotobacter vinelandii hiperproductoras de alginatos mediante tratamiento genético.
- Conservar a largo plazo las mutantes obtenidas con el propósito de mantener las características adquiridas.

3. GENERALIDADES

3.1 Azotobacter vinelandii

A. vinelandii es una bacteria de la familia Azotobacteraceae; presenta forma ovoide, pleomorfismo y agrupación en pares, aunque algunas veces forma cadenas cortas y estructuras irregulares. Su tamaño es relativamente grande pues mide de 1.5 a 2.0 micras. No producen esporas, pero se forman quistes de pared celular gruesa. Son Gram negativos o Gram variable. Los cultivos de 24 a 48 horas presentan movilidad por flagelos peritricos pero algunas veces pueden ser inmóviles.

Es fijador asimbiótico de nitrógeno. Produce alginato que acumula extracelularmente para favorecer la actividad de la nitrogenasa que requiere baja tensión de oxígeno. Cuando menos, 10 mg de nitrógeno atmosférico son fijados, por cada gramo de glucosa consumido. Para dicha fijación el microorganismo requiere de molibdeno que puede ser parcialmente **sustituido por** vanadio. No es proteolítico, **utiliza** nitratos, sales de amonio y **ciertos** aminoácidos como fuentes de nitrógeno, teniendo como consecuencia una **reducción** en la fijación de nitrógeno.

El pH de 7.0 a 7.5 es óptimo para su crecimiento y fijación de nitrógeno. Produce pigmento amarillo el cual se difunde en el medio de cultivo. Debido a la producción de alginato, las colonias son grandes y de aspecto mucoso. Su habitat natural es el suelo y el agua (2).

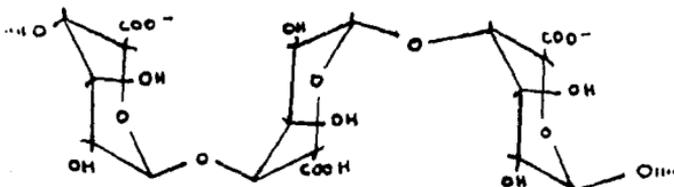
En la tabla 3-1 se enumeran algunas características fisiológicas y nutricionales de Azotobacter vinelandii

TABLA 3-1 NUTRICIONALES	CARACTERISTICAS DE <u>Azotobacter vinelandii</u> .	Y
Movilidad		+
Pigmento amarillo soluble en agua		+
Utilización de azúcares:		
Almidón		-
Ramnosa		+
Manitol		+
Malonato		+
Fructosa		+
Glucosa		+
Sacarosa		+
Reducción de nitrato a nitrito		+
Peroxidasa		+
Oxidasa		+
Producción de ácido sulfhídrico proveniente de tiosulfato		+
Etanol		+
Acetilmetilcarbinol		+
DL-malonato		+
Piruvato		+
Gluconato		+
Succinato		+
Crecimiento con NaCl 1%		+
Proporción de G+C en DNA: 66%		+

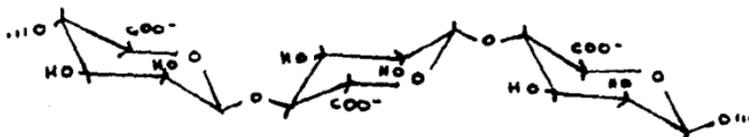
3.2 ALGINATOS

Los alginatos son sales de ácido algínico, el cual es un ácido orgánico débil que forma fácilmente sales al reaccionar con diferentes bases, siendo el alginato de sodio la sal más comúnmente utilizada. Estructuralmente el ácido algínico es un polímero formado por bloques de ácido D-manurónico unidos por enlaces β (1-4) y ácido L-gulurónico unidos por enlaces α (1-4), aunque también se pueden encontrar en forma alterna (fig. 3-1)

Figura 3-1 Estructuras de los componentes del ácido algínico



Bloque de ácido L-gulurónico con enlaces α - 1,4



Bloque de Ácido D-manurónico con enlaces β - 1,4

Los alginatos en presencia de iones calcio o cualquier otro catión polivalente forman geles de estructuras parecidas a las de cajas contenedoras de huevos (3,8) (fig. 3-2)

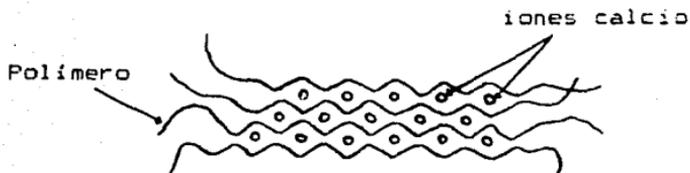


figura 3-2 Modelo del gel de alginato

Los alginatos con mayor contenido de poliguluronato forman geles resistentes que presentan un gran efecto de sinéresis; por el contrario los alginatos con mayor cantidad de polimanuronato forman geles suaves y elásticos por lo que el efecto de sinéresis es menor (3).

El ácido alginico así como su sal de calcio tienen una solubilidad limitada en agua; sus sales de sodio, potasio, amonio y propilenglicol se disuelven rápidamente en agua caliente o fría. La viscosidad de soluciones de alginatos disminuye al incrementar la temperatura, pero al enfriar se recupera la viscosidad original. Si la temperatura aplicada es muy elevada y por tiempos prolongados el polímero se puede degradar y en este caso la viscosidad de la solución se verá notablemente

reducida al enfriar.

El rango de pH al cual las soluciones de alginatos son estables con respecto a su viscosidad es de 4 a 10; por debajo de pH 4 la viscosidad se ve incrementada debido a la insolubilidad del ácido alginico libre; solo el alginato de propilenglicol es más estable en medios ácidos.

Los iones calcio o cualquier otro catión polivalente pueden aumentar la viscosidad en estas soluciones, por lo que es necesario usar agentes secuestrantes como fosfatos o polifosfatos que regulen la liberación de estos iones. Los geles así formados son claros, transparentes y no se licuan a temperatura ambiente.

La industria alimentaria es el principal consumidor de este hidrocoloide cuyos usos son como agente estabilizador en helados, nieves, quesos, leches malteadas y de espumas en cervezas; como agente gelante en pudines y gelatinas; como agente espesante en bebidas de frutas; como agente emulsificante en aderezos y como un agente formador de capa en recubrimientos de carnes y pescados.

En investigación el alginato de sodio es también ampliamente utilizado como agente gelante para inmovilizar células microbianas, de plantas o de mamíferos. Otro importante uso es como

intercambiador de iones por sus propiedades similares a las de resinas de intercambio iónico (14, 15, 17).

En 1881 Stanford extrajo alginatos de varias especies de Phaeophyceae o algas pardas. En la actualidad los alginatos comerciales son obtenidos de esta misma fuente. El método Stanford para la extracción de alginatos consiste en la maceración de las algas con carbonato de sodio al 10% durante 24 horas; se filtra la masa obtenida y el filtrado se somete a un tratamiento con ácido sulfúrico y ácido clorhídrico para precipitar ácido algínico el cual finalmente se filtra y se lava.

El ácido algínico es comercializado como tal o convertido en alginato de sodio.

Los alginatos así obtenidos son de muy buena calidad. Su producción está relacionada con el desarrollo de las algas, el cual depende de factores naturales como lo es la estación del año, localidad en que crecen y competencia con otros organismos por las diferentes especies de algas pardas.

Las técnicas utilizadas para la producción de alginatos bacterianos están en desarrollo y el uso de ellas tiene un futuro prometedor.

Los alginatos producidos extracelularmente por Azotobacter vinelandii tienen propiedades similares a las obtenidas de algas pardas; la principal diferencia es que los alginatos provenientes de Azotobacter vinelandii están parcialmente acetilados (9,12,16,20). Las enzimas involucradas en la biosíntesis de ácido alginico derivado de Azotobacter vinelandii fueron estudiadas por Pindar & Bucke en 1975. (21). El mecanismo de biosíntesis se esquematiza a continuación:

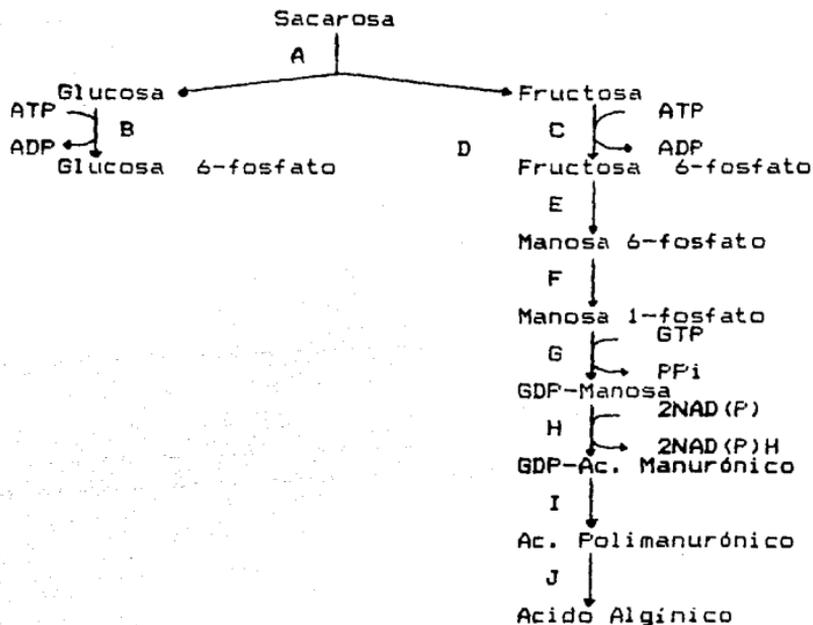


Figura 3-3 Ruta de biosíntesis de Ac. algínico por *Azotobacter vinelandii*.

- (A) Invertasa, (B) Glucocinasa, (C) Fructocinasa,
 (D) Fosfofructo-isomerasa, (E) Fosfomanosa-isomerasa,
 (F) Fosfomanomutasa, (G) GDP-manosa pirofosforilasa,
 (H) GDP-manosa - deshidrogenasa, (I) Polimerasa y
 (J) Acido polimanurónico 5-epimerasa.

La obtención de alginatos microbianos presenta ventajas con respecto a los procesos de extracción actuales, ya que es posible tener cultivos controlados además de que es factible realizar mejoramientos genéticos en las diferentes especies de bacterias, principalmente Agrobacter vinelandii, para incrementar la producción del biopolímero.

3.3. MUTACIONES

Las mutaciones pueden ocurrir como un proceso espontáneo y natural o pueden ser inducidas por agentes mutágenos físicos o químicos que producen cambios directos o indirectos en la estructura del DNA.

En general existen tres tipos de alteraciones que se producen en la secuencia de nucleótidos del DNA: 1) adición de uno o más nucleótidos; 2) supresión de uno o más nucleótidos y 3) sustitución de un nucleótido por otro. Las sustituciones de nucleótidos pueden ser de dos tipos generales, el primero es una sustitución de una purina por otra purina o una pirimidina por otra pirimidina. A estos cambios se les llama transiciones de pares de bases. El segundo tipo es una sustitución de una pirimidina por una purina y viceversa y se le llama transversión de pares de bases.

Los efectos de las mutaciones son potencialmente ilimitados. Pueden afectar al DNA durante su replicación o bien durante la transferencia de información, dando como resultado proteínas defectuosas debido a la alteración en la secuencia de nucleótidos. Las adiciones y supresiones con mayor frecuencia dan mutaciones sin

sentido, debido a la formación de codones terminales en el RNAm que provocan terminaciones prematuras en la traducción del mensaje genético o bien la inactivación del gen en el que está ubicado. Estos efectos son extremos y generalmente resultan mutaciones letales.

Las sustituciones también pueden provocar mutaciones sin sentido, pero es mayor la probabilidad de crear mutaciones con sentido equivocado. En este tipo de mutaciones son alterados uno o más tripletes del código de manera que se producen uno o más codones en el RNAm que especifican uno o más aminoácidos diferentes de los que se encuentran en la proteína normal. Las consecuencias potenciales de este tipo de mutación son muchas. Por ejemplo las alteraciones pueden variar desde la inactivación total de una enzima hasta los cambios más sutiles en la capacidad catalítica expresados por parámetros como las constantes de disociación aparente enzima-sustrato (K_m) o la capacidad catalítica máxima.

Los agentes químicos mutagénicos son muy numerosos; para aplicarlos al mejoramiento de cepas industriales es importante seleccionar aquellos que producen alteraciones menores. Entre los más utilizados están: ác. nitroso, 2-aminopurina,

etilmétanosulfonato, hidroxilamina, 5-bromouracilo, bisulfito de sodio y nitrosoguanidina que actúan a nivel del cromosoma, provocando sustituciones de bases nitrogenadas. Además del uso de agentes químicos, también existen agentes físicos mutagénicos, los más utilizados son la luz U.V. y las radiaciones ionizantes de alta energía. Las radiaciones U.V. con longitud de onda de aproximadamente 260nm tienen un efecto sobre las pirimidinas del DNA produciendo dímeros de timina-timina 50%, timina-citocina 40% y citosina-citosina 10%. La producción de dímeros de pirimidinas dentro de una cadena es lo más frecuente, pero los dímeros formados entre pirimidinas de cadenas adyacentes aparecen con una frecuencia del 10% aproximadamente. (4,6,7,22,23).

En la tabla 3-2 se enumera la acción de estos agentes mutágenos.

Tabla 3-2 Mutágenos utilizados para bacterias.

Mutágeno	Especificidad evidente <u>in vivo</u>
2-AP (2-aminopurina)	Transiciones AT GC
5-BU (5-bromouracilo)	Transiciones AT GC
Hidroxilamina	Transiciones AT GC
Bisulfito de sodio	Transición específica GC AT
EMS (etilmetanosulfonato)	Transición específica GC AT
NG (nitrosoguanidina)	La transición específica induce pequeñas sustracciones con muy baja velocidad GC AT
Ac. nitroso.	Transiciones y probablemente transver- siones, sustracciones
UV (radiación ultravioleta)	Transiciones y transver- siones, sustracciones, posiblemente induce inserciones y redistri- buciones cromosómicas

4. METODOS

4.1 Rehidratación de las cepas

Las cepas de Azotobacter vinelandii ATCC 9046 y Azotobacter vinelandii ATCC 12518 fueron rehidratadas en medio de Burk (anexo A) siguiendo la técnica del Cepario de la Facultad de Química. Las cepas hidratadas se conservaron a corto plazo mediante resiembras periódicas en agar de Burk modificado (anexo A).

4.2 Control e identificación de los microorganismos

Las cepas de Azotobacter vinelandii ATCC 9046 y ATCC 12518 se identificaron mediante observación microscópica, tinción Gram, pruebas bioquímicas (1) y se enviaron al laboratorio de Posgrado de Alimentos de la Facultad de Química donde se llevó a cabo la evaluación del polímero.

4.2.1 Determinación de las curvas de crecimiento

Con el fin de utilizar cepas en la fase adecuada de desarrollo, se hicieron las curvas de crecimiento en matraces con 350 ml de medio de Burk incubado a 30°C con agitación a 200 rpm. Se midió D.O (absorbancia) cada 6 horas en espectrofotómetro Coleman a 540 nm.

4.3 MUTAGENESIS

4.3.1 Mutación con luz UV

- a) Las cepas de Azotobacter vinelandii se sembraron en agar de Burk modificado y se incubaron a 30°C durante 72 horas.
- b) Se resuspendieron las cepas en 5 ml de agua destilada estéril.
- c) Posteriormente se hicieron diluciones 1:10 y 1:100 y se sembraron en cajas Petri con agar de Burk modificado, extendiendo el cultivo en toda la superficie con varillas de vidrio estériles.
- d) Las cajas se colocaron bajo la lámpara de luz UV, a una distancia de 15 cm, variando el tiempo de exposición desde 3 hasta 60 segundos.
- e) Una vez realizada la irradiación, se protegieron las cajas de la luz solar con papel aluminio para evitar el fenómeno de fotorreactivación.
- f) Las cajas se incubaron a 30°C durante 72 horas
- g) Se seleccionaron las colonias aisladas que por su tamaño y aspecto viscoso superaban a la cepa original y sobresalían en la placa. Para estudios posteriores se seleccionaron entre **3 y 10** colonias de cada caja Petri.

h) Las colonias seleccionadas se propagaron en tubos con agar de Burk. Después de 72 horas se llevó a cabo la tinción de cápsula y de Gram.

i) Se evaluó indirectamente la producción de alginato.

j) Las cepas hiperproductoras de alginatos se conservaron a corto plazo mediante resiembras periódicas y a largo plazo mediante liofilización.

4.3.2 Mutación con Etilmetanosulfonato (EMS)

a) Se cultivaron las cepas de A. vinelandii en medio de Burk modificado hasta llegar a la fase logarítmica.

b) Se tomaron 3 ml de cultivo y se centrifugaron a 7000 rpm durante 15 min,

c) Los paquetes celulares se resuspendieron en 2ml de medio de Burk.

d) Posteriormente se añadieron 0.04 ml de EMS e incubaron a 30°C de 1 a 2 horas.

e) Una vez transcurrido el tiempo se diluyeron las células 1:10 con buffer de fosfato de sodio 20 mM pH 7.2

f) Se centrifugaron los cultivos a 7000 rpm, 15 min a 4°C.

- g) Los paquetes celulares se lavaron dos veces con buffer de fosfato de sodio 20 mM, pH 7.2
- h) Después de cada lavado se centrifugaron bajo las condiciones mencionadas.
- i) Los paquetes celulares se resuspendieron en 1 ml de medio de Burk.
- j) Por último se puso 0.1 ml de la suspensión en cajas Petri con agar de Burk modificado, extendiendo el cultivo en toda la superficie de la placa con varillas de vidrio estériles y se incubaron a 30°C durante 72 horas.
- k) Una vez transcurrido el tiempo de incubación se seleccionaron las colonias más grandes y viscosas, se propagaron, se observaron al microscopio y se enviaron al laboratorio de Posgrado de Alimentos donde se llevó a cabo la evaluación del polímero.
- l) Las cepas hiperproductoras de alginatos se conservaron a corto plazo mediante resiembras periódicas y a largo plazo mediante liofilización.

4.4 LIOFILIZACION

- a) Se verificaron las características morfológicas y fisiológicas del microorganismo.
- b) Se sembró el microorganismo en agar inclinado de Burk modificado.

c) Cosecha: el cultivo se resuspendió en 3ml de leche descremada al 10%. Se adicionó 0.3 ml a cada ampolleta previamente etiquetada y esterilizada. De la suspensión se tomó una muestra de 0.5ml para la prueba de viabilidad.

d) Las ampolletas se congelaron a -78°C con una mezcla de dióxido de carbono y etanol.

e) Se llevó a cabo el sellado con un soplete, generando vacío en cada ampolleta.

f) Para verificar la eficiencia del proceso, las ampolletas se sometieron a una prueba de vacío con un generador de alto voltaje, a prueba de sellado sometiéndolas a cambio brusco de presión y se determinó humedad residual por el método de Karl Fischer.

g) Por último se rehidrataron 3 ampolletas para verificar viabilidad así como las características morfológicas y fisiológicas del microorganismo.

4.5 DETERMINACION DE VISCOSIDAD

Se midió el tiempo que tarda en fluir el agua a 30°C por un viscosímetro Cannon NO2cA378 y posteriormente se hizo la medición del tiempo de flujo de los caldos de fermentación a la misma temperatura.

5. RESULTADOS Y DISCUSION

5.1 CURVAS DE CRECIMIENTO

Las curvas de crecimiento de *Azotobacter vinelandii* ATCC 12518 y *Azotobacter vinelandii* ATCC 9046, se presentan en las figuras 5-1 y 5-2, en las cuales se indican la fase lag ó de adaptación (I), la fase log (II) y la fase estacionaria (III) del crecimiento de los microorganismos.

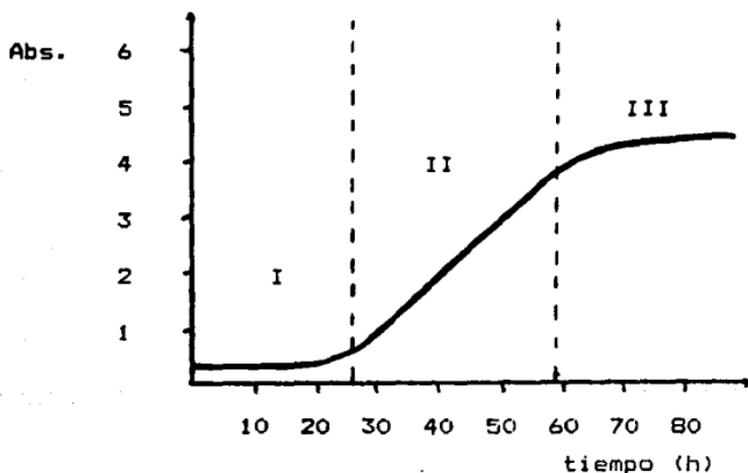


Figura 5-1 Curva de crecimiento de *A. vinelandii* ATCC 12518 en medio de Burk con amortiguador a 30°C y 200 rpm.

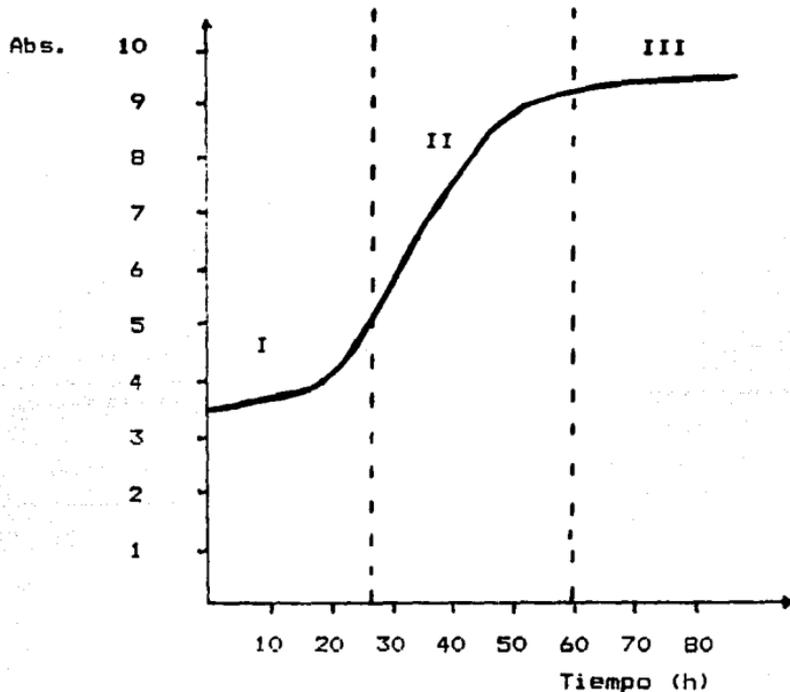


Figura 5-2 Curva de crecimiento de *A. vinelandii* ATCC 9046 en medio de Burk con amortiguador a 30°C y 200 rpm

Para la realización de la mutación química se utilizaron cultivos en fase logarítmica de crecimiento, a la cual se llega después de aproximadamente 36 horas de incubación, según se observa en las curvas de crecimiento.

5.2 MUTAGENESIS CON LUZ U.V.

Después de la irradiación con luz U.V. se escogieron 43 colonias por su aspecto macroscópico y se examinaron posteriormente en el microscópio. De estas colonias se seleccionaron 6, a las cuales se les evaluó la formación del polímero mediante la determinación de la viscosidad relativa de los medios de cultivo con respecto al agua. Aunque este no es un parámetro cuantitativo permite inferir la productividad de las cepas mutantes con respecto a la cepa original. Para la realización de esta prueba se llevó a cabo una fermentación en medio de Burk con amortiguador (anexo A), el pH inicial fué de 7.2 y se incubó a 30°C con agitación circular a 200 rpm durante 72 horas, el volumen del medio fué de 350 ml en matraz E.M. de 500 ml.

En el cuadro I se presentan los resultados obtenidos de las cepas originales y de las cepas tratadas con luz U.V.

CUADRO I. Resultados de la mutación con luz U.V.

No. de cepa	Tiempo (seg) de exposición a la luz u.v.	Viscosidad relativa
ATCC 9046	-----	1.23
9046 - 1	10	2.90
9046 - 2	20	4.43
9046 - 3	30	1.25
9046 - 5	10	1.70
9046 - 6	20	3.25
ATCC 12518	-----	1.19
12518 - 1	10	1.10

5.3 MUTAGENESIS CON EMS

Según los datos reportados en la literatura, el tiempo necesario para la mutagénesis con EMS es de 1-2 horas (7,19), por lo cual ésta se realizó durante 2h, 1.5h y 1h, seleccionando 15, 7, y 3 colonias respectivamente. De las 25 colonias elegidas solamente 5 tuvieron las características macro y microscópicas deseadas. A éstas cepas se les determinó su viscosidad relativa con respecto al agua como en el caso anterior. Los resultados se presentan en el cuadro II.

CUADRO II. Resultados de la mutación con EMS		
No. de cepa	Tiempo de reacción (Hrs)	Viscosidad relativa
ATCC 9046	-----	1.23
9046 - B	2	4.23
9046 - C	2	60.41
9046 - F	2	97.91
ATCC 12518	-----	1.17
12518 - D	2	1.25
12518 - F	2	1.12

Como se puede observar en los cuadros I y II las cepas de mayor producción de alginatos son la 9046-2, 9046-C y la 9046-F. Estas cepas se conservaron a corto plazo mediante resiembras y a largo plazo mediante liofilización. Comprobando posteriormente su viabilidad y características.

Los datos de liofilización y las características de los microorganismos antes y después del proceso se presentan en los siguientes cuadros.

CUADRO III. Datos de liofilización

Nombre de la cepa: A. vinelandii ATCC 12518

No. de liofilización: 1

Fecha: Sep 89

Medio de propagación: Agar de Burk modificado

Medio de soporte: Leche descremada al 10%

Método de congelación: Mezcla dióxido de carbono
- etanol (-78°C)

Aparato utilizado: Liofilizadora Labconco

Número de ampolletas: 16

Humedad remanente: 0.6%

CUADRO IV. Características de A. vinelandii
ATCC 12518 antes y después de la liofilización

CONTROL	ANTES DEL PROCESO	DESPUES DEL PROCESO
Pureza	Satisfactoria	Satisfactoria
Viabilidad	incontables en 10^{-4}	incontables en 10^{-4}
Viscosidad relativa	1.19	1.19
Forma	bacilos cortos	bacilos cortos
Agrupación	en pares y en cadenas cortas	en pares y en cadenas cortas
Tinción Gram	-	-
Cápsula	+	+
Movilidad	+	+
Almidón	-	-
Manitol	+	+
Ramnosa	+	+
Catalasa	+	+

CUADRO V. Datos de liofilización

Nombre de la cepa: A. vinelandii ATCC 9046

No. de liofilización: 1

Fecha: Sep 88

Medio de propagación: Agar de Burk modificado

Medio de soporte: Leche descremada al 10%

Método de congelación: Mezcla dióxido de carbono
- etanol (-78°C)

Aparato utilizado: Liofilizadora Labconco

Número de ampollitas: 18

Humedad remanente: 1%

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

CUADRO VI. Características de *A. vinelandii*
ATCC 9046 antes y después de la liofilización

CONTROL	ANTES DEL PROCESO	DESPUES DEL PROCESO
Pureza	satisfactoria	satisfactoria
Viabilidad	incontables en 10^{-6}	incontables en 10^{-6}
Viscosidad relativa	1.23	1.23
Forma	bacilos cortos	bacilos cortos
Agrupación	en pares y en cadenas cortas	en pares y en cadenas cortas
Tinción Gram	-	-
Cápsula	+	+
Movilidad	+	+
Almidón	-	-
Manitol	+	+
Ramnosa	+	+
Catalasa	+	+

CUADRO VII. Datos de liofilización

Nombre de la cepa: A. vinelandii 9046-2

Tipo de mutación: Física con luz u.v.

No. de liofilización: 1

Fecha: Sep 88

Medio de propagación: Agar de Burk modificado

Medio de soporte: Leche descremada al 10%

Método de congelación: Mezcla de dióxido de carbono-etanol (-78°C)

Aparato utilizado: Liofilizadora Labconco

Número de ampollitas: 20

Humedad remanente: 0.44%

CUADRO VIII. Características de *A. vinelandii* 9046-2 antes y después de la liofilización

CONTROL	ANTES DEL PROCESO	DESPUES DEL PROCESO
Pureza	satisfactoria	satisfactoria
Viabilidad	incontables en 10^{-4}	incontables en 10^{-5}
Viscosidad relativa	4.43	4.43
Forma	bacilos cortos	bacilos cortos
Agrupación	en pares y en cadenas cortas	en pares y en cadenas cortas
Tinción Gram	-	-
Cápsula	+	+
Movilidad	+	+
Almidón	-	-
Manitol	+	+
Ramnosa	+	+
Catalasa	+	+

CUADRO IX. Datos de liofilización

Nombre de la cepa: A. vinelandii 9046-C

Tipo de mutación: Química con EMS

No. de liofilización: 1

Fecha: Sep 89

Medio de propagación: Agar de Burk modificado

Medio de soporte: Leche descremada al 10%

Método de congelación: Mezcla de dióxido de carbono-etanol (-78°C)

Aparato utilizado: Liofilizadora Labconco

Número de ampollitas: 18

Humedad remanente: 2.3%

**CUADRO X. Características de A. vinelandii
9046-C antes y después de la liofilización**

CONTROL	ANTES DEL PROCESO	DESPUES DEL PROCESO
Pureza	satisfactoria	satisfactoria
Viabilidad	incontables en 10⁻⁷	incontables en 10⁻⁴
Viscosidad relativa	60.41	60.41
Forma	bacilos cortos	bacilos cortos
Agrupación	en pares y en cadenas cortas	en pares y en cadenas cortas
Tinción Gram	-	-
Cápsula	+	+
Movilidad	+	+
Almidón	-	-
Manitol	+	+
Ramnosa	+	+
Catalasa	+	+

CUADRO XI. Datos de liofilización

Nombre de la cepa: A. vinelandii 9046-F

Tipo de mutación: Química con EMS

No. de liofilización: 1

Fecha: Sep 89

Medio de propagación: Agar de Burk modificado

Medio de soporte: Leche descremada al 10%

Método de congelación: Mezcla de dióxido de carbono-etanol (-78°C)

Aparato utilizado: Liofilizadora Labconco

Número de ampolletas: 19

Humedad remanente: 1.2%

CUADRO XII. Características de *A. vinelandii* 9046-F antes y después de la liofilización

CONTROL	ANTES DEL PROCESO	DESPUES DEL PROCESO
Pureza	satisfactoria	satisfactoria
Viabilidad	incontables en 10 ⁻⁶	incontables en 10 ⁻⁶
Viscosidad relativa	97.91	97.91
Forma	bacilos cortos	bacilos cortos
Agrupación	en pares y en cadenas cortas	en pares y en cadenas cortas
Tinción Gram	-	-
Cápsula	+	+
Movilidad	+	+
Almidón	-	-
Manitol	+	+
Ramnosa	+	+
Catalasa	+	+

6. CONCLUSIONES

Se lograron los objetivos del trabajo, de obtener cepas de Azotobacter vinelandii hiperproductoras de alginatos mediante tratamiento genético y de conservarlas a largo plazo, confirmando la estabilidad de sus características aun después de un año.

Sin embargo para asegurar la conservación de estas cepas se recomienda seguir verificando la viabilidad y estabilidad de las ampollitas liofilizadas.

A N E X O A
MEDIOS DE CULTIVO

1. MEDIO DE BURK

fosfato de potasio dibásico	0.66 g
fosfato de potasio monobásico	0.16 g
cloruro de sodio	0.20 g
sulfato de magnesio heptahidratado	0.20 g
sulfato de calcio dihidratado	0.05 g
molibdato de sodio dihidratado	2.9 mg
cloruro férrico	27.4 mg
sacarosa	20.0 g
agua destilada	1000 ml
pH final	7.2

Preparación del medio: se disuelven las sales de potasio y la sacarosa en 600 ml de agua destilada. El sulfato de calcio se disuelve en 200 ml, y las sales restantes en los últimos 200 ml de agua. Se esteriliza por separado a 121°C, 15 lb de presión durante 15 min. Las tres fracciones del medio ya estériles se mezclan y se ajusta el pH a 7.2 con NaOH estéril.

2. MEDIO DE BURK CON AMORTIGUADOR

Para la preparación de medio Burk con amortiguador se utiliza el medio anterior y se le adiciona 1.43g de Ac. 3(N-morfolino) propanil sulfónico (MOPS) en la primera fracción.

3. MEDIO AGAR DE BURK

Para la preparación de agar de Burk se utiliza medio de Burk y se le adiciona 15g/l de agar bacteriológico (Difco).

4. MEDIO AGAR BURK MODIFICADO

fosfato de potasio manobásico	0.20 g
fosfato de potasio dibásico	0.80 g
sulfato de magnesio heptahidratado	0.20 g
sulfato de calcio dihidratado	0.10 g
cloruro férrico	27.4 mg
molibdato de sodio	2.9 mg
extracto de levadura	0.50 g
sacarosa	20.0 g
agar	15.0 g
agua destilada	1000 ml

Preparación del medio: se disuelven las sales de potasio, la sacarosa, el extracto de levadura y el agar en 600 ml de agua destilada; el

sulfato de calcio dihidratado en 300 ml y las demás sales en 100 ml. Se esterilizan por separado a 121°C, 15 lb de presión durante 15 min. Una vez estériles las fracciones de medio se mezclan y se ajusta el pH con NaOH 0.5N estéril.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Anison, G. & Cooperwhite, I. (1986). Effect of limiting substrate concentration, growth rate and aeration on alginate composition and production by *Azotobacter vinelandii* in continuous culture. Food Hydrocolloids 1, No.2, 101-111.
2. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1984). Williams & Wikins. Vol.1, p 220-231
3. Blanhard, J.M.V. Ffist, M.A., Mitchell, J.R., Bsc, Rhd, Aifst (1978). Polysaccharides in food. Chapter 12. Butterworths USA.
4. Bohinski, R.C. (1978). Bioquímica. Cap. 18 Fondo Educativo Interamericano. México.
5. Bucke, C., Deavin, L., Lawson, C.J. & Findar, D.F. (1975). The Production of Industrially Important Bacterial Polysaccharides. Biochem. Journal. 152, 617-622
6. Deretic, V., Gill, J.F. & Chakrabarty, A.M. (1987). Alginate Biosynthesis: A model system for gene regulation and fuction in *Pseudomonas*. Biotechnology 5, May 1987, 469-477.
7. Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Costilow, R.N., Nester, E.W., Wood, W.A., Krieg, N.R. and Phillips g.B. (1981). Manual of Methods for General Bacteriology American Society for Microbiology. Washington D.C.
8. Glyn, O., Phillips, D., Wedlock, J. & Peter A.W. (1984) Gums and Stabilisers for the Food Industry 2 Applications of hidrocolloids p. 177-188. Pergamon Press. Great Britain.
9. Gorin, P.A.J. & Spencer, J.F.T. (1966). Exocellular alginic acid from *Azotobacter vinelandii*. Canadian Journal of Chimestry 44, 993-998.
10. Hacking, A.J. Taylor, I.W.F., Jarkman, T.R. & Govan, J.R.W. (1983). Alginate biosynthesis by *Pseudomona mendocina*. Journal of General Microbiology. 129, 3473-3480

11. Henry, J.P. (1967). Microbial Technology. Chapter 16. Reinhold Publishing Corporation. U.S.A.
12. Horan, N.J., Jarman, T.R. & Dawes, E.A. (1981). Effects of carbon source and inorganic phosphate concentration on the production of alginic acid by a mutant of *A. vinelandii* and on the enzymes involved in its biosynthesis. Journal of General Microbiology 127, 185-191.
13. Jarman, T.R., Deavid, L., Slocombe, S., & Righelato, R.C. (1978). Investigation of the effect of environmental conditions on the rate of exopolysaccharide synthesis *Azotobacter vinelandii*. Journal of General Microbiology 107, 59-64.
14. Kang, K.J. & Cottrell, I.W. (1979). Polysaccharides in Pepter, H.J. & Perlman, D. Microbial Technology, Vol. 1 Chapter 13. Academic Press N.Y.
15. Klos, R.E & Glicksman, M. "Gums" in T.E. Furia Handbook of Food Additives' CRC Press, Clevelan Ohio 1975
16. Larsen, B. & Haug, A. (1971). Biosynthesis of alginate. Part I. Composition and structure of alginate produced by *A. vinelandii*. Carbohydrate Research 17, 287-296.
17. Margaritis, A. & Pace, G.W. (1985) in Murray Moo-Young. Comprehensive Biotechnology. Vol.3, Chapter 49 p.p. 1005-1044. Pergamon Press. Great Britain.
18. Mc. Inerney, M.J., Holmes, K.S., Hoffman, P. & Der Vartanian, D.V. (1984). Respiratory mutants de *A. vinelandii* with elevated levels of cytochrome d. Eur. J. Biochem. 141, 447-452.
19. Miller, J.F. (1977) Experiments in Molecular Genetics. p.p. 135-139. Cold Spring Harbor Laboratory. Third Printing. U.S.A.
20. Okabe, E., Nakajima, M., Murooka, H. & Nisizawa, K. (1981). Investigation of Carbon and Phosphorus Sources in Cultural Media of a Selected Strain of Alginate-producing *A. vinelandii*. J. Ferment. Technol. 59 No.1, 1-7.

21. Finder, D.F. & Bucke, C. (1975). The Biosynthesis of Alginic Acid by *A. viscolagum*. Biochem. Journal. **152**, 617-622
22. Scriban, R. (1985). Biotecnología. Cap. 10. El Manual Moderno. México.
23. Wolfgang, K.J., Hilda P.W. and D. Bernard Amos (1983) Zinsser Microbiología 17a. Edición Cap. 8. Editorial Medica Panamericana. Buenos Aires.