

140  
201

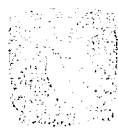


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

PRODUCCION DE ALGINATOS POR  
FERMENTACION CON Azotobacter vinelandii

ESTADO CON  
FALTA DE ORIGEN



EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A:  
SOLIS PEREZ MARIA PATRICIA

México, D. F.

1990



## **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.

## INDICE

INTRODUCCION	2
OBJETIVOS	5
1. GENERALIDADES	6
1.1 QUIMICA DE ALGINATOS	7
1.2 PRODUCCION DE ALGINATOS	8
1.2.1 EXTRACCION DE ALGAS	8
1.2.2 CARACTERISTICAS DE LOS ALGINATOS	15
1.3 PRODUCCION MICROBIANA	17
1.3.1 MICROORGANISMOS	18
1.3.2 NUTRIENTES	21
1.3.3 ASPECTOS CINETICOS	26
1.4 RECUPERACION	28
1.5 APLICACIONES	32
2. MATERIAL Y METODOS	35
2.1 MUTACION Y MANTENIMIENTO DE CEPAS	36
2.2 FERMENTACION EN MATRAZ	40
2.3 FERMENTACION EQUIPO LH 2000 SERIE I	40
2.4 DETERMINACIONES	41
3. RESULTADOS Y DISCUSION	44
4. CONCLUSIONES	72
BIBLIOGRAFIA	75

## INTRODUCCION

El mundo de la biología vive actualmente una verdadera revolución. Los microorganismos y las células de las plantas se pueden programar para aumentar la producción de algunos compuestos naturales, productos del metabolismo primario y secundario. Surge así, la Biotecnología Moderna que se ha definido como la utilización de microorganismos, células o sus partes, para la producción de bienes y servicios.

En la Industria Alimentaria se han presentado desarrollos de las diferentes disciplinas involucradas en la Biotecnología y probablemente se tendrá en esta rama avances en la disponibilidad de nuevas materias primas y editivos para la elaboración de alimentos.

La Microbiología Industrial implica la utilización de microorganismos en procesos industriales. De estos procesos se derivan una gran variedad de productos, tales como aminoácidos, vitaminas, ácidos orgánicos, enzimas, etc. En particular, la posibilidad de producir polisacáridos microbianos ha abierto un enorme mercado, debido a la aplicación que las gomas han tenido en las Industrias Alimentaria y Farmacéutica, así como los polímeros en la química.

Las gomas son polisacáridos que pueden disolverse o dispersarse en agua para formar soluciones o suspensiones viscosas o bien geles.

En general, las gomas se clasifican en tres grandes grupos según su origen:

- naturales: provienen de exudados de árboles, extractos de plantas, extractos de semillas, algas, almidones de cereales, almidones de tubérculos, almidones naturales, proteínas vegetales y gomas microbianas.

- modificadas o semisintéticas: derivadas de celulosa, almidones y otros.

- sintéticas: derivadas de petroquímicos.

Debido a sus propiedades reológicas, las gomas tienen un campo muy amplio en la Industria Alimentaria usándose como estabilizantes, espesantes, suspendedores, formadores de películas, saulsificantes, etc. Dentro de ellas las xantanas tienen amplias aplicaciones por su poder viscosante y los alginatos por su poder gelificante.

Alginato es el término general para designar los derivados hidrofílicos de ácido alginico. Es un poliacárido aniónico formado de ácido D-manurónico y ácido L-gulurónico en proporciones variables. Son extraídos de algas marinas de la clase Phaeophyceae.

En la actualidad los alginatos comerciales se extraen de algas. Sin embargo existen algunas limitantes dentro de las que destacan:

- a) deficiencias en el suministro de materia prima,

- b) proceso laborioso de purificación , especialmente si se requiere para el mercado de alimentos o farmacéutico.
- c) variaciones de composición estacional y en función de especies.

Una alternativa a los polímeros naturales o modificados es el desarrollo de polisacáridos microbianos; la mayor fuente de éstos son los mucilagos producidos por algunos microorganismos capsulados. Es así como las xantanas y dextranas han llegado a ocupar un lugar preponderante dentro de la industria consumidora de biopolímeros. En relación con los alginatos se presentan dos soluciones biotecnológicas potenciales al problema de abasto: la producción por fermentación y el aislamiento de la epimerasa para aumentar el grado de alginatos bajos en ácido gulurónico.

La producción de exopolisacáridos se presenta en muchas especies de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas. Ciertas bacterias como las fijadoras de nitrógeno atmosférico Azotobacter vinelandii y Pseudomonas aeruginosa producen alginatos en condiciones adecuadas de fermentación.

Conviene señalar que las propiedades gelificantes de los alginatos no han podido substituirse por otros biopolímeros microbianos, además de ser un proyecto económicamente interesante para nuestro país, pues importa la integridad de sus alginatos, a pesar de ser exportador de la materia prima.

Los objetivos de este trabajo son:

- 1) Encontrar las condiciones óptimas para la obtención de alginatos por fermentación con mutantes de la bacteria Azotobacter vinelandii, manejando las siguientes variables: sustrato, concentración de sustrato y concentración de fosfatos, pH, aireación y agitación.
- 2) Obtener una goma de alto rendimiento y de buena calidad con características funcionales adecuadas y comparables a las gomas de origen vegetal, con un costo y un abasto estable.

## 1. GENERALIDADES

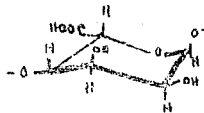
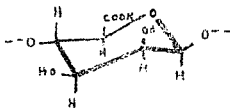
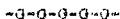


## 1.1 QUIMICA DE ALGINATOS.

Alginato es el término general para designar los derivados hidrofílicos del ácido alginico el cual es un compuesto orgánico complejo que contiene los monómeros de ácido manurónico y gulurónico. Su peso molecular se ve afectado por el proceso de extracción y depende de la fuente de obtención (P.M. 25,000 a 1,5 millones).

Ambos ácidos urónicos están constituidos por anillos unidos a la cadena molecular por enlaces  $\alpha$  1,4. Al realizar una hidrólisis ácida se obtienen tres fracciones: dos formadas por la unidad de los monómeros y una con monómeros alternados. (11)

En la figura 1, se presenta la estructura de los segmentos de polímero contenidos en el ácido alginico y la correspondiente a las unidades básicas.



ACIDO D-MANURONICO

ACIDO L-GULURONICO

FIGURA 1. ESTRUCTURA DE LAS UNIDADES BASICAS Y LOS SEGMENTOS DE LOS ALGINATOS.

Las propiedades funcionales de los alginatos son determinadas por la relación M (manurónico) / G (gulurónico) y su distribución en el polímero. Se ha encontrado que los alginatos varían en la proporción de ácido manurónico, en porcentajes que van del 25 al 75 %, relación que proporciona al gel resistencia y la capacidad de formar fibras.

Los alginatos con largas proporciones de poliguluronato tienden a formar geles rígidos que están sujetos a sinéresis, mientras que aquellos en los que predomina el ácido polimanurónico forman geles más elásticos y que no muestran mucha sinéresis. (7)

La viscosidad y propiedades reológicas de las dispersiones de alginato se ven influenciadas por:

- la concentración del polímero,
- el peso molecular promedio,
- las interacciones con otros constituyentes y
- el esfuerzo cortante al que se sujeten.

## 1.2 PRODUCCION DE ALGINATOS.

### 1.2.1 EXTRACCION DE ALGAS.

El ácido alginico se encuentra en todas las especies de algas caféas largas y en algunas especies pequeñas.

La mayoría de los alginatos son extraídos de las algas gigantes Macrocystis pyrifera que crece en las aguas

litorales de California y se encuentran en capas de 50 pies a 1 milla de ancho, de 25 a 80 pies de profundidad y varias millas de longitud.

El alginato se puede encontrar en diferentes proporciones en algunas algas, según se muestra en la tabla 1. (11).

TABLA 1. CONTENIDO DE ALGINATO DE DIVERSAS ESPECIES DE ALGAS

Espeoie	% Base seca
<u>Laminaria digitata</u>	15 - 40
<u>Laminaria saccharina</u>	15 - 35
<u>Laminaria hyperborea</u>	14 - 35
<u>Ascobhyllum</u>	18 - 30
<u>Fucus serratus</u>	18 - 29
<u>Fucus granoides</u>	21 - 30
<u>Macrocystis</u>	13 - 20
<u>Durvillea antarctica</u>	20 - 43
<u>Durvillea willana</u>	36 - 44

Las algas sintetizan estos polimeros como componente estructural de la pared celular o como reserva de energía. El alginato se encuentra en el mucilago intracelular y en la pared celular como sal de metales divalentes, pero en particular como alginato de calcio que es sintetizado junto con las membranas de la célula que actúan como soporte para algunas enzimas.

El sistema membranoso en retículo endoplásmico, el aparato de Golgi y el plasma son responsables del transporte y síntesis de la pared celular y otros polisacáridos así como glicoproteínas de la célula.

El aparato de Golgi está involucrado en el mecanismo de transporte para exportar polisacárido y en la síntesis y modificación del material durante el transporte.

La fuente de obtención, el habitat y la parte de la planta usada para la extracción afectan la proporción de los monómeros presentes. Esta situación se ilustra en la tabla 2. (11)

TABLA 2. PROPORCION DE LOS TRES COMPONENTES DEL ACIDO ALGINICO SEGUN LA FUENTE DE OBTENCION.

FUENTE	ACIDO MANURONICO	ACIDO GULURONICO	ALTERNADOS
<u>Macrocystis pyrifera</u>	40.6	17.7	41.7
<u>Ascophyllum nodosum</u>	38.4	20.7	41.0
<u>Laminaria hyperborea</u>	12.7	60.5	26.8

El alga es recolectada mecánicamente por medio de barcos colectores y son cortadas 3 pies bajo la superficie aunque en algunos países se recolecta manualmente en

pequeños botes.

Los procesos comerciales de extracción más empleados en la Industria son el proceso en frío Green's (usado por Kelco Co.) y el proceso Le Gloahec-Herter (usado por Algin Corporation of America).

En el proceso frío llamado así porque es conducido a temperaturas relativamente bajas (10 °C), las algas marinas frescas son lixiviadas por varias horas con HCl 0.33%. El líquido es removido y después de picar y desmenuzar las algas lixiviadas, se digieren con una solución de NaOH (18-23 Kg por Ton de alga) a un pH aproximado de 10 por un tiempo de treinta minutos. La fibra obtenida, se lava con seis volúmenes de agua y el material fibroso es secado y vendido como alginato de sodio crudo.

Para obtener un producto puro, la fibra es filtrada con ayudafiltro y presión a una temperatura de 40.9°C para facilitar el proceso. La fibra filtrada se añade a una solución de cloruro de calcio al 10-11 %; el precipitado lixiviado se separa, se le añade HCl al 1% que convierte el alginato de calcio en fibras de ácido alginico.

En la figura 2 se presenta el diagrama de flujo del proceso.

En el proceso Gloaher-Herter se colocan tres partes de solución de cloruro de calcio al 0.8 - 1.0 %, que puede estar fría o caliente, por una parte de algas. La función del cloruro de calcio es eliminar algunas sales. Posteriormente reciben un tratamiento en HCl (5%) con el fin de disolver cualquier sal alcalina; se digiere con NaOH al 4 % en una proporción de dos volúmenes de solución por uno de algas. Se lixivia aproximadamente 2 horas (40°C) y es macerada para reducirla a una pasta la cual se diluye en agua y se homogeniza. Posteriormente se centrifuga a altas revoluciones y se deja reposar en un tanque clarificador donde después de 6-10 horas las partículas de celulosa se aglomeran y flotan para formar un sombrero, mientras que el licor es removido. Dicho licor es decolorado con gelatina, comunmente 20-25 partes por 100 partes de material alginico, eliminando la gelatina por centrifugación. El producto se precipita con HCl concentrado, se coloca en drenadoras y es purificado con solventes como alcohol etílico o propenol para finalmente secarse.

El diagrama de flujo del proceso se muestra en la figura 3.

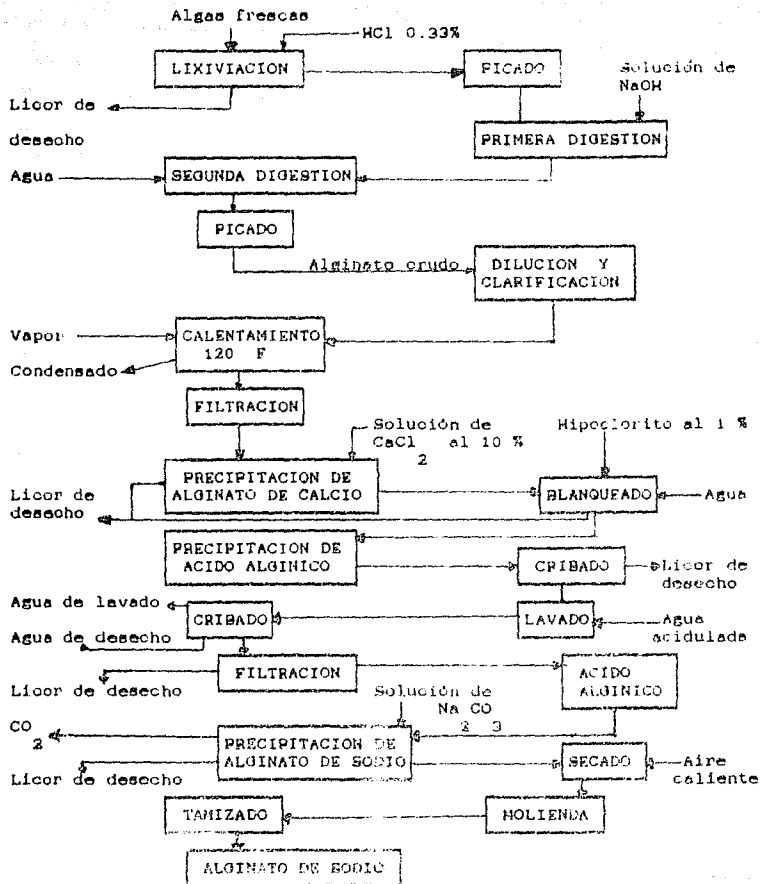


FIGURA 1. DIAGRAMA DEL PROCESO EN FRIJO GREEN S.





### 1.2.2 CARACTERISTICAS DE LOS ALGINATOS

Las propiedades de los alginatos dependen de la relación M-G y se ven afectadas por la edad, localización y variedad de las algas, así como el método de extracción. (25)

**SOLUBILIDAD.** El ácido alginico es insoluble en agua fría y ligeramente soluble en agua caliente. Sus sales son solubles en agua fría y/o caliente para dar una solución que no coagula con calor, ni gelifica en frío. Dado que estos materiales son hidrofóbicos presentan una tendencia a aglutinarse; las altas agitaciones y adiciones graduales disminuyen esta tendencia.

**VISCOSIDAD.** La viscosidad de las soluciones depende de:

- la concentración,
- peso molecular del alginato,
- presencia de cationes metálicos y algunos electrólitos,
- grado de polimerización (relación M-G),
- temperatura y
- pH.

Su viscosidad varía de 10 a 2000 cp para una solución al 1 % de baja viscosidad y valores mayores para soluciones de alta viscosidad.

Si se mantiene a temperaturas elevadas por periodos prolongados puede haber degradación de la molécula y disminuir su viscosidad. La viscosidad máxima se obtiene cerca de la neutralidad, mientras que a pH

inferiores a 4 tienden a aumentar la viscosidad debido a la baja solubilidad del ácido libre y a pH mayores de 10 las soluciones son inestables. Por otra parte los iones de metales polivalentes incrementan la viscosidad y pueden causar gelificación.

**GELIFICACION.** Las soluciones de sales solubles de alginato tienden a formar geles en solución ácida o en presencia de calcio u otros cationes metálicos divalentes. Al formarse un gel estará compuesto de un 99-99.5 % de agua y 0.5-1.0 % de alginato de calcio. En la figura 4 se presenta el probable mecanismo de entrecruzamiento del alginato con los iones calcio. (11)

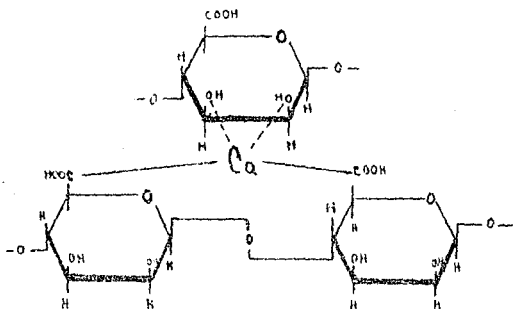


FIGURA 4. MECANISMO PROBABLE DE ENTRECruzAMIENTO DE ALGINATO CON EL ION CALCIO.

La formación del gel puede ser controlada por la presencia de un secuestrante como fosfato o polifosfato. **FORMACION DE PELICULAS.** Se pueden preparar secando una

capa delgada de una solución de alginato soluble por tratamiento con un metal di o trivalente, con una solución ácida o por extrusión de una solución en un baño precipitante. Estas películas son flexibles, claras, correasas, resistentes a grasa, aceites y solventes orgánicos.

INTERCAMBIO IÓNICO. Los alginatos tienen propiedades de intercambio iónico que dependerán de la proporción de ácidos urónicos presentes.

### 1.3 PRODUCCION MICROBIANA.

Existen diferentes hipótesis sobre la función de polisacáridos extracelulares para la célula, entre los que se encuentran:

- protección contra condiciones ambientales adversas,
- adhesión a superficies sólidas e
- incremento de su patogenicidad.(39)

Los polisacáridos microbianos pueden ser de tres tipos: intracelulares, extracelulares o estructurales. Por otra parte algunos exopolisacáridos forman cápsulas alrededor de la célula y tienen la habilidad de difundirse a la fase líquida durante la fermentación.

Los productos de fermentación microbiana ofrecen como ventajas reproducir las propiedades físicas y químicas con un costo y suministro estable.

La mayor fuente de nuevos polisacáridos son los mucilagos secretados por algunos microorganismos.

### 1.3.1 MICROORGANISMOS

Podemos encontrar producción de exopolisacáridos por bacterias Gram-positivo, Gram-negativo y por una amplia variedad de hongos. Ciertas bacterias, como la fijadora de nitrógeno Azotobacter vinelandii, producen el polisacárido alginato de estructura similar al de la fuente vegetal.

Se asume que los exopolisacáridos microbianos son sintetizados dentro de la célula por un mecanismo análogo al de síntesis de pared celular. Azotobacter vinelandii produce alginato extracelular en medio de Burk donde la composición del medio y las condiciones ambientales son parámetros críticos para obtener un buen rendimiento de producto.

Azotobacter vinelandii es un microorganismo aerobio obligado, fijador de nitrógeno, Gram-negativo y heterótrofo.

De acuerdo con algunos estudios (99,21), las enzimas involucradas en la biosíntesis de exopolisacárido pueden clasificarse en cuatro grupos:

- I Metabolismo inicial del sustrato.
- II Síntesis + interconversión de nucleótidos de azúcares.
- III Transferasas, responsables de la formación de monosacáridos y
- IV Polimerasas que forman la molécula de biopolímero.

La ruta metabólica más probable para la producción de ácido alginico se presenta en la figura 5. (9)

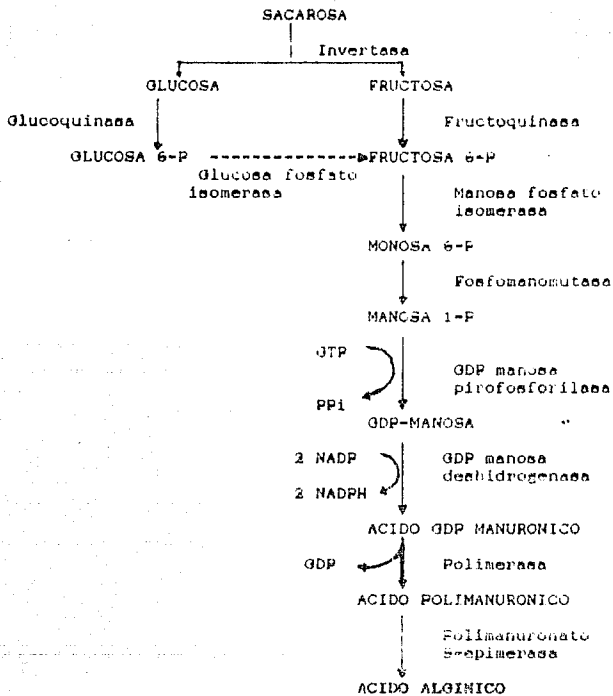


FIGURA 5. RUTA METABOLICA MAS PROBABLE PARA LA PRODUCCION DE ACIDO ALGINICO.

Entre las ventajas de la producción de la goma por fermentación tenemos:

- Preparación del medio: reactivos de alta disponibilidad y medio de cultivo definido.

- Fermentación: se pueden tener controles en el proceso, por lo tanto una mayor eficiencia; posibles cultivos continuos que reeditarían en una alta productividad.

- Recuperación del producto: se pueden usar condiciones suaves por lo que hay poca degradación del producto. (29)

Desventajas de la obtención por fermentación:

- alta viscosidad que resulta en baja concentración del producto por lo tanto son necesarios grandes volúmenes y capacidad fermentativa.

- alto requerimiento de energía para transferencia de oxígeno, mezclado y eliminación de agua y

- dificultades para eliminar las células.

El polímero producido por Azotobacter vinelandii tiene casi la misma estructura que el de origen algal, con escasas diferencias. Aproximadamente uno de cada 10 carbonos C<sub>2</sub> y C<sub>3</sub> está parcialmente acilado. Por otra parte según diferentes reportes son ricos en ácido manurónico.

### 1.3.2 NUTRIENTES

#### FUENTE DE CARBONO

La producción de exopolisacárido ocurre bajo condiciones de exceso de carbohidrato y limitación de nutrientes que no sean el carbón y la fuente de energía.

La fuente de carbono empleada, tiene un efecto muy importante en la concentración final del producto, además de estar relacionada a otros factores como son el exceso o limitación de fosfatos. Este efecto se muestra en la tabla 3.

Con base en algunos estudios como los que muestra la tabla 3 se ha concluido que la mejor fuente de carbono

es la sacarosa; la concentración que se recomienda es de 20 g/l. Sin embargo Azotobacter vinelandii presenta una alta respiración por lo que mucha de la sacarosa es usada sin control y perdida como CO<sub>2</sub>. (29)

2

TABLA 3. EFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO, EN LA PRODUCCION DE ALGINATOS POR Azotobacter vinelandii, BAJO CONDICIONES DE EXCESO Y LIMITACION DE FOSFATO. (21)

FUENTE DE CARBONO 20 g/l	EXCESO DE FOSFATOS BIOMASA ALGINATOS		LIMITACION DE FOSFATOS BIOMASA ALGINATOS	
	g/l	g/l	g/l	g/l
Sacerosa	2.0	2.2	1.0	5.6
Glucosa	2.5	2.0	1.7	3.4
Fruetosa	2.3	1.8	0.8	5.0
Manosa	0.6	0.0	0.4	0.0
Sorbitol	2.1	0.0	1.2	4.1
Manitol	1.7	0.8	1.2	3.9
Glicerol	3.5	1.8	1.3	3.4
Gluconato	2.4	0.5	1.4	5.2
Acetato	-----NO CRECIO-----			



TABLA 4. MEDIO EMPLEADO PARA LA PRODUCCION DE ALGINATO  
 CON Azotobacter vinelandii. ( MEDIO DE BURK ).

K HPO <sub>2</sub> 4	0.64 g
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.16 g
NaCl	0.20 g
MgSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0.20 g
CaSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	63 mg
Na MoO <sub>4</sub> .2 H <sub>2</sub> O	2.9 mg
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27.4 mg
SACAROSA	20.0 g
Aforado a 1 litro y ajustado a pH 7.2	

#### FUENTE DE NITROGENO.

Azotobacter vinelandii es un microorganismo fijador de nitrógeno atmosférico, pero si existe una fuente orgánica o inorgánica en el medio de cultivo es utilizada inhibiéndose la fijación.

La fijación de nitrógeno consiste en la conversión de nitrógeno gaseoso a compuestos disponibles para los microorganismos, que lo usan como fuente de nitrógeno pero nunca como fuente de energía.

El crecimiento del microorganismo es proporcional a la fijación de nitrógeno, si el medio de cultivo está libre de compuestos nitrogenados. Por otra parte, se ha observado una mayor síntesis de alginato en condiciones limitantes de nitrógeno.

Algunos estudios han demostrado que la presencia de nitrato de amonio, glutamato u otro aminoácido en el medio de cultivo no mejora la producción de alginato, ni afecta el crecimiento del microorganismo. (8)

#### FUENTE DE OXIGENO

La cantidad de oxígeno disponible es un factor determinante en la producción de alginato, ya que regula la transformación de sustrato a biomasa.

Si se presentan altas concentraciones de oxígeno, el microorganismo usa más energía para protección del sistema nitrogenosa teniéndose como consecuencia un bajo rendimiento celular.

Una buena producción de alginato se lleva a cabo en condiciones limitantes de oxígeno. La eficiencia de conversión de sacarosa a alginato aumenta al disminuir la respiración como respuesta al suministro de oxígeno. Si el suministro de oxígeno es bajo, el microorganismo acumula poli-3-hidroxi-butirato en lugar de producir alginato.

#### FUENTE DE FOSFATOS

Se ha demostrado que la cantidad de alginato producido a partir de Azotobacter vinelandii en cultivo continuo depende de la cantidad de fosfato inicial, incrementándose al disminuir la concentración inicial de fosfato.

Con base en algunos estudios se ha observado que la producción de alginato continúa después del crecimiento cuando opera en condiciones limitantes de fosfatos. En general la conclusión parece ser que la menor cantidad de biomasa se obtiene cuando el contenido de fosfatos es bajo, siendo responsables de la producción de alginato.

#### FUENTE DE CALCIO

La cantidad de iones calcio en el medio influye en la relación M/O en el alginato; bajas concentraciones de calcio dan lugar a un polisacárido rico en ácido manurónico.

La actividad del ion calcio decrece conforme se produce alginato, debido a la afinidad que presentan.

Se ha observado que un incremento en la concentración de calcio en el medio después de que se ha producido cierta cantidad de alginatos, lleva a un cambio en la composición de alginato.

Se sugiere como fundamento de los fenómenos anteriores la existencia de una enzima que es capaz de epimerizar los residuos de ácido manurónico en ácido gulurónico en la presencia del ion calcio. (37)

#### OTROS NUTRIENTES

Se han realizado algunos estudios sobre síntesis de alginato que demuestran que cantidades substanciales de exopolisacárido se logran con  $\text{MoO}_4^{2-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{K}^+$

como sustratos limitantes. En la tabla 5 se presenta el efecto de diversos nutrientes en la producción de células y alginato.

TABLA 5. EFECTO DE NUTRIENTES EN LA PRODUCCION DE ALGINATO POR Agrobacter vinelandii (12)

NUTRIENTE LIMITANTE	BIOMASA g/l	ALGINATO g/g CELULAS/h
2- MOO	1.1	0.34
4 3- PO	1.9	0.28
4 2+	1.4	0.25
Fe	1.3	0.25
C (Sacarosa)	1.5	0.22
N	1.2	0.20
2 2+	1.9	0.16
Ca	1.2	0.06
+		
K	1.2	0.06
O		
2		

### 1.3.3 ASPECTOS CINETICOS.

La relación entre crecimiento y formación de exopolisacárido varía entre microorganismos y en una fermentación particular cambia con las condiciones del proceso.

Durante la síntesis de alginato con Agrobacter vinelandii se observa una independencia en el grado de

producción de polímero y el crecimiento como puede constatar en la figura 6. (12)

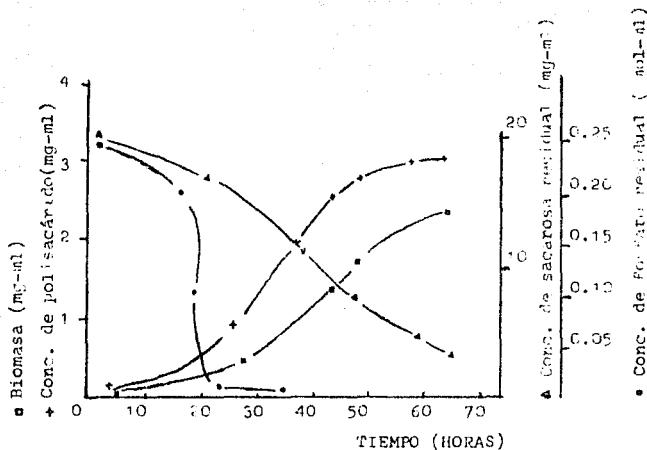


FIGURA 6. PRODUCCION DE ACIDO ALGINICO POR Azotobacter vinelandii.

La producción de alginato se inicia momentos después de la fase logarítmica. Se observa un incremento marcado en la producción de polisacárido al terminar el crecimiento del microorganismo como se aprecia en la figura 7. (21)

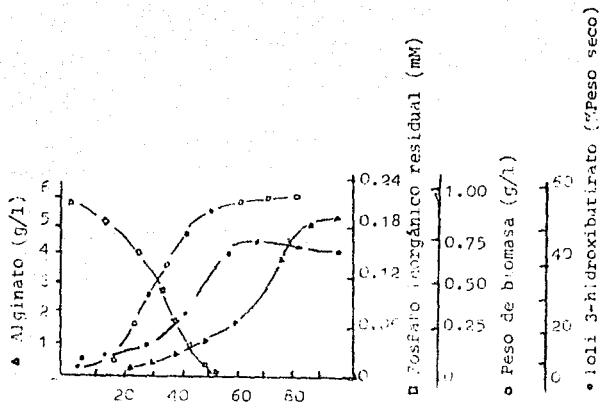


FIGURA 7. CRECIMIENTO Y PRODUCCION DE ALGINATO DE Azotobacter vinelandii, BAJO CONDICIONES LIMITANTES DE FOSFATOS.

#### 1.4 RECUPERACION

La recuperación del exopolisacárido en un proceso fermentativo es un punto crítico para determinar el costo y propiedades funcionales del producto terminado. Las condiciones adecuadas de fermentación junto con las de recuperación definen la viabilidad económica del

proyecto, ya que hay que tener en cuenta que el costo de recuperación es una parte significativa del costo total de producción.

La presencia de células en el producto final puede afectar su aplicación, así como, la de algunas enzimas puede causar problemas en procesos subsiguientes o impartir características indeseables.

En el caso de polisacáridos microbianos los tratamientos posfermentativos incluyen:

- concentrar o extraer el caldo de fermentación a una forma sólida, microbiológicamente estable y fácil de manejar, transportar y almacenar y que puede redisolverse para su aplicación.

- purificar para reducir el nivel de contaminantes y mejorar sus características funcionales (color, olor y sabor).

- desactivar enzimas extracelulares no deseadas, tales como celulasas y pectinasas.

- modificar o alterar químicamente el producto con el fin de mejorar sus propiedades funcionales de manejo de sólidos o sus características de solución o dispersión.

(39).

El proceso posfermentativo sigue, como se observa, la tecnología usada para la extracción de algas.

La recuperación puede incluir diferentes tipos de tratamientos entre los que se encuentran:

- tratamiento térmico. Aunque si se usan altas temperaturas puede haber degradación del producto; sin

embargo es requerido para la esterilización.

-tratamientos físicos. Como son centrifugación o filtración, la coagulación de partículas por calentamiento con sales, adsorción de partículas a unas adicionadas, tratamiento térmico con alcohol, cetona, fenol y surfactantes no iónicos,

-tratamientos químicos ácido y alcalino. El polianión alginato puede ser precipitado como ácido alginico con adición de HCl a un pH aproximado de 4.

-tratamiento enzimático. Se ha propuesto el uso de enzimas para, entre otros objetivos, separar eficientemente las células del producto.

La separación del polisacárido se logra bajando la solubilidad del polímero para obtener un precipitado o una solución concentrada por adición de sales o solventes miscibles en agua como metanol, etanol, isopropanol o acetona.

El isopropanol es el alcohol más utilizado, debido principalmente a su facilidad de recuperación, su costo, su potabilidad y a que es aceptado para productos grado alimenticio. (39)

Se deben de controlar las condiciones de secado ya que se pueden afectar las propiedades del producto como: color, solubilidad y propiedades reológicas, o bien afectar el contenido residual de solventes. Para este paso del proceso se utilizan generalmente



secadores a vacío, aire forzado o gas inerte si contiene solventes orgánicos inflamables.

El polisacárido seco es molido a un determinado tamaño de partícula para controlar dispersabilidad y disolución así como facilidad de manejo.

Los polímeros solubles en agua son generalmente secados a un 10 % de humedad y en este estado son higroscópicos por lo que es importante que el empaque usado sea de baja permeabilidad al agua. Finalmente en la figura 9 se presenta el diagrama recomendado para la recuperación de alginato.

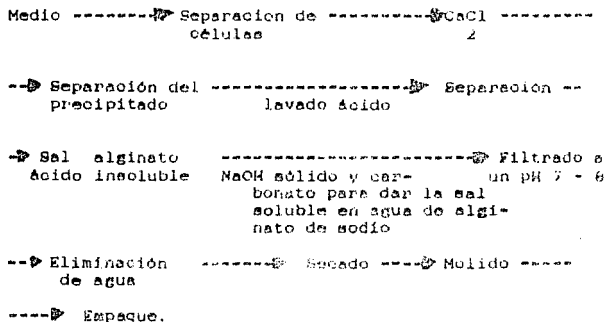


FIGURA 9. PROCESO RECOMENDADO PARA RECUPERACION DE ALGINATO. (9)

## 1.5 APLICACIONES

Debido a las propiedades mencionadas anteriormente, los alginatos tienen una amplia aplicación industrial que está determinada por el peso molecular, la concentración y la composición química del producto. Algunas de estas aplicaciones se presentan en la tabla 6.

En la Industria de alimentos se usa para controlar las propiedades reológicas de muchos productos, no contribuye al valor nutritivo ya que los humanos no lo metabolizan, además de no impartir sabor ni olor a los productos finales.(3)

Puede ser adicionado para retener agua e inhibir la cristalización del hielo.

Las aplicaciones más importantes en la Industria Alimentaria se resaltan en la tabla 7.

Los alginatos de sodio, potasio, calcio y amonio son reconocidos por la FDA como sustancias Grasas. (Generalmente reconocidas como seguras)

**TABLA 6. PRINCIPALES INDUSTRIAS Y PROCESOS DE APLICACION DE ALGINATOS.**

Industria alimentaria	aditivos
Industria textil	material útil para vestido y resistente; producción de fibras
Industria farmacéutica	penicilina y preparaciones farmacéuticas, pastillas
Odontología	moldes y modelos dentales
Polimerización	agente estabilizante
Pinturas	espesante para pinturas
Litografía	espesante para tintes
Industria automotriz	Limpiadores y pulidores de carros
Cerámica y refractarios	agente estabilizador
Agricultura	fertilizantes, insecticidas
Industria de adhesivos	endurecedor y para unir fibras en tejidos
Industria azucarera	Clarificación de soluciones azucaradas y aguas minerales
Cosméticos	cremas, gelatinas, spray para cabello, desodorantes, shampoo, mascarillas faciales y jabones.

TABLA 7. PRINCIPALES APLICACIONES DE LOS ALGINATOS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA.

Estabilizador de espumas	cerveza
Estabilizador de emulsiones	embutidos, salsa, aderezos bebidas dietéticas
Agente suspendedor	pastelería, mezclas instantáneas, pudding
Formador de películas	recubrimientos, capas protectoras
Formador de geles	gelatinas, pudding, pastas para relleno, natillas, queso untable
Agente para dar cuerpo	aderezos, rellenos de pastelería, postres
Adhesivo	glaseado para pasteles
Inhibidor de cristalización	helados, jarabes, postres congelados, confitería
Agente clarificante	vino, cerveza
Agente ligante	salsas, comida enlatada
Agente encapsulante	sabores mezclados en polvo
Agente floculante	vinos

## 2. MATERIALES Y METODOS

### 3.1 MUTACION Y MANTENIMIENTO DE CEPAS

#### Material.

Tubos de ensayo de 16 x 150 y 22 x 175.  
Matraces aforados de 100 y 1000 ml.  
Probetas de 100 y 1000 ml.  
Matraces Erlen-Meyer de 100, 250 y 500 ml.  
Pipetas automáticas.  
Aeas,  
Campana de flujo laminar.  
Autoclave.  
Incubadora.

#### REACTIVOS

Sacarosa  
Fosfato de potasio dibásico,  
Fosfato de potasio monobásico,  
Sulfato de calcio dihidratado,  
Cloruro de sodio,  
Sulfato de magnesio heptahidratado,  
Molibdato de sodio dihidratado,  
Cloruro férrico,  
Ac. 3(N-morfolino) propanil sulfónico (MOPS),  
Hidróxido de sodio y  
Agua destilada.

#### MÉTODOS.

Las cepas silvestres y mutadas fueron proporcionadas por Julieta González A., usando las siguientes técnicas:

##### Mutación con luz UV

- Se desarrollaron las cepas de Azotobacter vinelandii durante 72 horas a 30°C en agar Burk modificado.
- Se resuspenden las cepas en 5 ml de agua destilada estéril.
- Se hacen diluciones de 1:10 y 1:100.
- De las diluciones anteriores se pone 1 ml en cada caja petri que contiene agar Burk modificado,

extendiendo el cultivo en toda la superficie con varillas de vidrio estériles.

e) Las cajas se exponen a la luz UV de longitud de onda de 260 nm, a una distancia de 15 cm, variando el tiempo de exposición desde tres hasta sesenta segundos.

f) Después de ser irradiadas, las cajas se protegen de la luz con papel aluminio para evitar fotoreactivación.

g) Se incuban a 30°C durante 72 horas.

h) De las colonias que se hayan desarrollado se seleccionan las que por su tamaño y aspecto viscoso superen a la cepa original y sobresalgan en la placa.

i) Las colonias seleccionadas se propagan en medio con agar Burk. Después de 72 horas se hace observación microscópica y tinción de Gram.

j) Las cepas hiperproductoras se conservan en fresco y liofilizadas.

k) A estas colonias se les evalúa producción de alginato por un método indirecto midiendo viscosidad.

#### Mutación con Etilmetano sulfonato (EMS)

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

b) Se toman 3 ml de cada cepa y se centrifugan a 7 000 rpm durante 15 min.

- c) Los paquetes celulares se resuspenden en 2 ml de medio de Burk.
- d) Posteriormente cada cepa se mezcla con 0.04 ml de EMS.
- e) Se incuban a 30°C de 1 a 2 horas.
- f) Después del tiempo transcurrido se diluyen las cepas 1:10 con buffer de fosfato de sodio 20 mM, pH 7.2.
- g) Se centrifugan las cepas a 7000 rpm, 15 min. a 4°C.
- h) Los paquetes celulares se lavan dos veces con buffer de fosfato de sodio 20 mM, pH 7.2.
- i) Después de cada lavado las cepas son centrifugadas bajo las condiciones mencionadas.
- j) Los paquetes celulares se resuspenden en medio Burk.
- k) Por último se coloca 0.1 ml de cada cepa en una de las cajas Petri que contienen agar Burk modificado, extendiendo en toda la superficie de la placa con varillas de vidrio estériles y se incuban a 30°C durante 72 horas.
- l) Transcurrido el tiempo, se seleccionan las colonias más grandes y viscosas, se propagan, se observan al microscopio y se evalúa la producción de alginato.
- m) Las cepas hiperproductoras de alginatos se conservan en fresco y liofilizadas.

#### Mantenimiento de cepas.

Las cepas fueron mantenidas en medio inclinado de Burk, libre de Nitrógeno, solidificado con 2 % de agar, cuya



composición se muestra en la tabla 8.

TABLA 8. COMPOSICION DEL MEDIO DE BURK (LIBRE DE NITROGENO)

Sacarosa	20.00 g
Fosfato de potasio dibásico	0.66 g
Fosfato de potasio monobásico	0.16 g
Sulfato de calcio dihidratado	50.00 mg
Cloruro de sodio	0.20 g
Sulfato de magnesio heptahidratado	0.20 g
Molibdato de sodio dihidratado	2.90 mg
Cloruro férrico	27.40 mg
MOPS	1.43 g
Agua destilada	1.00 l
pH final 7.2 ajustado con NaOH 0.5 N	

Preparación del medio: se disuelven las sales de potasio, la sacarosa y el MOPS en 600 ml de agua destilada; el sulfato de calcio en 200 ml de agua destilada y las sales en los 200 ml de agua restantes. Estas tres fracciones se esterilizan por separado, para evitar precipitaciones en la autoclave, a 121 C (15 lb. de presión) durante 15 min. Las fracciones ya estériles se mezclan bajo campana de flujo laminar y se ajusta el pH a 7.2 con NaOH estéril.

## 2.2 FERMENTACION EN MATRAZ

PRIMERA ETAPA. Las fermentaciones se llevaron a cabo en matraces Erlen-Meyer de 500 ml con 100 ml de medio Burk, inoculadas de tubos inclinados e incubado tres días a 30 °C en una incubadora a 100 rpm.

Durante esta etapa se probaron diferentes fuentes de carbono ( glucosa, fructosa, sacarosa ), concentraciones iniciales de fosfatos, el uso de MOPS y algunas de las cepas mutadas con luz UV.

SEGUNDA ETAPA. Se llevaron a cabo las fermentaciones en matraces Erlen-Meyer de 500 ml a 30°C, pero en este caso se presentaron variaciones en los volúmenes de medio empleado 50 a 350 ml, agitación 50 a 200 rpm y concentración inicial de sustrato 5 a 20 g/l.

TERCERA ETAPA. En base a los resultados anteriores se trabajó en matraces Erlen-Meyuer de 500 ml con 350 ml de medio Burk a 200 rpm. Durante esta etapa se probaron las cepas obtenidas de las mutaciones químicas.

## 2.3 FERMENTACION EN EQUIPO LM 2000 SERIE I

El inóculo se obtiene en matraces Erlen-Meyer de 500 ml con 350 ml de medio, inoculado de tubo inclinado e incubado tres días a 30°C y 200 rpm.

Estos cultivos se usan para inocular 4 litros de medio contenidos en el fermentador, en el cual se estudió el efecto de variaciones en las condiciones del proceso

(agitación y aireación).

#### 2.4 DETERMINACIONES

Determinación de pH: El pH se determinó en un potenciómetro Beckman 41.

Determinación de densidad óptica: Del caldo de fermentación se efectúa una dilución 1:30 en agua destilada y se lee contra un blanco de agua destilada a 520 nm en el espectrofotómetro Shimadzu UV-1202.

Determinación de biomasa: Se pipetea 5 ml del caldo de fermentación sobre un filtro de fibra de vidrio previamente tarado y colocado en el equipo millipore. Se aplica vacío y se lava con dos porciones de 5 ml de agua destilada. Se seca a peso constante a 100°C.

Determinación de sacarosa: Para este método se emplea la técnica de DNS para medición de azúcares reductores. Se disuelve la enzima en buffer de citratos 0.32 M, pH 4.6 a una concentración de 2.5 mg/ml. La solución obtenida es transparente y estable por una semana almacenada a 4 °C.

Curva estándar. se prepara una solución patrón de sacarosa 1 mg/ ml en un astraz aforado de 100 ml. Se

toman alícuotas de 1.0, 4.0, 8.0, 12.0, 16.0 y 20.0 ml y se afora a 100 ml para tener concentraciones de 0.1, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, y 2.0 mg/ml. De estas, se toman 0.9 ml y se colocan en tubos de ensayo, se adicionan 0.1 ml de la solución enzimática y una vez mezclado se deja reposar 15 minutos a 25- 30°C; se adiciona 1 ml de DNS y se colocan en un baño en ebullición. Transcurridos 5 minutos se enfría inmediatamente, se adicionan 10 ml de agua destilada. Finalmente se lee a 540 nm contra un blanco de reactivos y agua destilada.

Preparación de la muestra. La muestra se centrifuga a 10 000 rpm por 10 minutos a una temperatura de 4 °C; el sobrenadante se diluye con agua destilada y de las diluciones se toman alícuotas de 0.9 ml y se procede igual que para la curva estándar. Los datos se procesan por regresión lineal, y el resultado se corrige por la dilución realizada.

Determinación de alginatos: El sobrenadante es centrifugado para eliminar las células y se toma una alícuota de 25 ml a la que se le añaden 3 volúmenes de 2-propanol. Se agitan y se dejan reposar 10 minutos. Las fibras precipitadas son filtradas en papel Whatman No. 1 previamente tarado y colocado en el equipo millipore. Se aplica vacío y se lava con dos volúmenes de 2-propanol; se seca al vacío a 45°C por 24 horas;

se pesa y por diferencia se calcula el contenido de alginato en la muestra.

Determinación de viscosidad: Se empleó un viscosímetro Cannon NO2CA878. Debido a los inconvenientes que se presentaron para la separación de las células del alginato se determinó la viscosidad de los caldos de fermentación como una medida indirecta de la concentración de alginato presente en el medio (Se relacionó con la viscosidad del agua medida en las mismas condiciones). Cabe resaltar que esta medida únicamente nos sirve como método de comparación para inferir la productividad de las cepas autadas. No es un parámetro cuantitativo pero al realizar la determinación con soluciones estándar los resultados obtenidos fueron satisfactorios.

Se procede de la siguiente forma: se mide el tiempo de flujo del agua a 30°C y posteriormente el tiempo de flujo de los caldos de fermentación a la misma temperatura en un viscosímetro, con la ayuda de un cronómetro.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSION

#### PRIMERA ETAPA.

El trabajo se dividió básicamente en tres etapas: en la primera se probaron las diferentes fuentes de carbono, concentración de fosfatos y el uso de MOPS como regulador de pH.

Conviene señalar que el trabajo se realizó en forma paralela con un proyecto de producción de cepas hiperproductoras por mutaciones realizadas con luz UV. De esta forma se fue avanzando en la optimización del proceso y al mismo tiempo, incorporando nuevas cepas.

#### FUENTES DE CARBONO ANALIZADAS

Se analizó la influencia de la fuente de carbono, en la producción de alginato, probándose la glucosa, fructosa, sacarosa y la combinación de glucosa y fructosa.

TABLA 9 OPTIMIZACION DE LA FUENTE DE CARBONO

FUENTE DE CARBONO	CONCENTRACION INICIAL DE AZUCAR g/l	CONCENTRACION FINAL DE AZUCAR g/l	CONCENTRACION DE ALGINATO g/l
GLUCOSA	19.95	15.71	1.94
FRUCTOSA	19.37	19.31	0.00
GLUCOSA + FRUCTOSA	19.94	17.32	0.40
SACAROSA	30.41	11.17	7.01

Cepa Azotobacter vinelandii silvestre ATCC 12519  
Temperatura 30°C Agitación 100 rpm  
Tiempo de fermentación 50 h  
Volumen del medio 100 ml medio/matraz de 500 ml

De acuerdo con la tabla 9 se observa que la mejor fuente de carbono a ser empleada es la sacarosa, aunque se hubiera pensado en una mayor facilidad para metabolizar glucosa o fructosa.

Posteriormente se realizaron fermentaciones con diferentes concentraciones de fosfatos. Los resultados se muestran en la tabla 10.

TABLA 10. OPTIMIZACION DE LA CONCENTRACION INICIAL DE FOSFATO EN EL MEDIO DE CULTIVO DE A. vinelandii PARA LA PRODUCCION DE ALGINATOS

FOSFATOS mM	SACAROSA RESIDUAL g/l	BIOMASA g/l	ALGINATO g/l
0.25	22.24	0.08	0.39
5.00	15.24	1.08	0.52
10.00	15.21	1.32	0.77
5.00 *	18.02	0.80	0.43

Cepa Agrobacter vinelandii silvestre ATCC 12916  
 Temperatura 30°C Agitación 100 rpm  
 Tiempo de fermentación 50 h  
 Volumen del medio 100 ml de medio/matraz 500 ml  
 Concentración inicial de sacarosa 20 g/l  
 \* Volumen del medio 200 ml en matraz de 500 ml



TABLA 11. USO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE FOSFATOR A pH 7.7

FOSFATOS mM	pH FINAL	SACAROSA g/l	BIOMASA g/l	ALGINATO g/l
0.00	7.70	20.04	0.03	0.34
0.50	7.40	6.26	2.58	0.69
5.00	7.35	5.71	2.08	0.69
10.00	7.45	6.17	1.85	0.76

Cepa Azotobacter vinelandii silvestre ATCC 12518  
 Temperatura 30°C Agitación 100 rpm  
 Tiempo de fermentación 50 h  
 Volumen del medio 100 ml de medio/matraz 500 ml  
 Concentración inicial de sacarosa 20 g/l

En base a las tablas anteriores podemos observar que es de suma importancia para el desarrollo del microorganismo y para la producción de alginato la presencia de fosfatos; en la tabla 11 se demuestra que una ausencia de desarrollo del microorganismo, cuando en la fermentación no existen fosfatos. En concentraciones de 5 y 10 mM se presenta mejor desarrollo del microorganismo. Cabe señalar que al inicio del proyecto se presentaron problemas para determinación de alginato, dando como resultado controversias en los datos, pero con base en algunas observaciones sobre biomasa y viscosidad del medio se optó por trabajar con una concentración de 5 mM de fosfatos.

En la tabla 12 se presenta la comparación de las dos cepas silvestres adquiridas de la ATCC.

TABLA 12 COMPARACION DE LAS CEPAS SILVESTRES DE Azotobacter vinelandii

CEPA	SACAROSA RESIDUAL g/l	BIOMASA g/l	ALGINATO g/l
9046	1.17	2.09	0.55
12518	1.20	2.12	0.73

Temperatura 30°C                      agitación 100 rpm  
Tiempo de fermentación 50 h  
Volumen de fermentación 100 ml de medio/matraz 500 ml  
Concentración inicial de sacarosa 30 g/l

De este estudio comparativo se decidió trabajar con la ATCC 12528 que presentaba mayor productividad en las condiciones de trabajo empleadas. Esta cepa sirvió igualmente de base para los trabajos de mutación.

De acuerdo con los datos bibliográficos recopilados se probó el uso de MOPS (Ácido 3 (N-morfolino) propanil sulfónico) como regulador de pH con el fin de mantener este cercano a 7.2, valor óptimo para el desarrollo del microorganismo. Esto es debido a que el uso de un regulador de fosfatos, adecuado para la zona de trabajo, afectaría la producción como se demostró en la tabla 10.

Los resultados se presentan en la tabla 13.

TABLA 13. EFECTO DE USO DE UN SISTEMA REGULADOR DE pH (MOPS) EN LA FERMENTACION EN MATRAZ DE ALGINATOR POR A. vinelandii

MOPS mM	SACAROSA g/l	BIOMASA g/l	ALGINATO g/l
25	5.37	1.06	1.53
50	4.18	1.18	2.71

Cepa Azotobacter vinelandii silvestre ATCC 12518  
Temperatura 30°C Agitación 100 rpm  
Tiempo de fermentación 50 h  
Volumen de fermentación 100 ml de medio/matraz de 500 ml  
Concentración inicial de sacarosa 20 g/l  
pH inicial de la fermentación 7.2

Como podemos observar en la tabla 13, se logró una mayor productividad de alginato empleando MOPS por lo que se decidió que en lo sucesivo se emplearía como constituyente del medio de cultivo.

Efecto del pH.

Se realizó una comparación de diferentes valores de pH inicial para encontrar el valor óptimo para la fermentación, en términos de la producción de alginato. Los resultados se presentan en la tabla 14.

TABLA 14. COMPARACION DE DIFERENTES VALORES DE pH INICIAL EN CRECIMIENTO Y PRODUCCION DE ALGINATOS POR A. vinelandii

pH		SACAROSA RESIDUAL g/l	BIOMASA g/l	ALGINATO g/l
INICIAL	FINAL			
6.2	6.15	8.93	1.61	1.58
6.7	6.65	7.75	2.04	1.08
7.2	7.10	7.70	1.89	1.92
7.7	7.45	7.73	1.54	2.42
8.2	7.60	8.17	1.59	2.49

Cepa Azotobacter vinelandii ATCC 12518  
 Temperature 30°C Agitación 100 rpm  
 Volumen de fermentación 100 ml de medio/matraz de 500 ml  
 Concentración inicial de sacarosa 20 g/l

De acuerdo con los resultados mostrados en la tabla 14 se observa que valores de pH de 7.7 y 8.2 son adecuados, sin embargo en la tabla 13 se presentan mejores resultados con un pH de 7.2 y el uso de MOPS por lo que se continuó trabajando con estas condiciones.

Se realizó también un lote de fermentaciones ajustando el pH con NaOH y NH<sub>4</sub>OH con el fin de observar si la presencia de nitrógeno favorecía la fermentación, ya que nuestro medio está libre de nitrógeno teniendo en cuenta que el microorganismo empleado tiene la capacidad de fijarlo del ambiente. Los resultados se presentan en la tabla 15.

TARLA 15. EFECTO DE LA REGULACION DE pH CON NaOH Y NH<sub>4</sub> OH EN LA FERMENTACION DE A. vinelandii

4

CONDICION	pH FINAL	SACAROSA RESIDUAL g/l	BIOMASA g/l	ALGINATO g/l
25mM M NaOH	6.9	1.14	2.97	1.02
50mM M NaOH	7.1	0.49	3.26	1.37
25mM M NH <sub>4</sub> OH	5.4	2.99	2.55	1.10
50mM M NH <sub>4</sub> OH	5.4	2.20	3.16	0.97

Cepa Agrobacter vinelandii 12816  
 Temperatura 30°C Agitación 100 rpm  
 Tiempo de fermentación 50 h  
 Volumen de fermentación 100 ml de medio/matraz de 500ml

En dicha tabla, se observa que no presentó ninguna ventaja para el desarrollo y la productividad del microorganismo la presencia de nitrógeno en el medio, por lo que las fermentaciones se continuaron ajustando con NaOH sin presentarse inconvenientes en las fermentaciones.

En esta etapa del proyecto se utilizó la primer serie de mutantes sobreproductoras. Las condiciones en las que se obtuvieron dichas mutantes se presentan en la tabla 16. Una primera evaluación de las cepas se presenta en la tabla 17.



Como puede observarse en la tabla 17, hay un aumento en la concentración final de alginato con las cepas mutadas con luz UV. Se presenta una medida indirecta de la concentración de alginato que nos sirve como comparación sin presentar los márgenes de error de la determinación vía precipitación con 2-propanol. Se obtiene una relación de tiempo de flujo del caldo de fermentación con respecto al tiempo de flujo del agua a la misma temperatura, según se describió en materiales y métodos.

Se encontró que los mejores resultados se obtenían con la cepa 9046-2 por lo que se empleó en el trabajo subsecuente.

#### SEGUNDA ETAPA.

En esta etapa se realizaron algunas pruebas para determinar el volumen de medio y la agitación óptimos (que indirectamente determinan los requerimientos de oxígeno en el medio de cultivo). Para este efecto se colocaron matraces de 500 ml con diferentes volúmenes de medio ( 50 y 250 ml) y a dos diferentes velocidades de agitación (60 y 100 rpm) y matraces en los que a la mitad del tiempo de fermentación se variaba el volumen del medio transfiriéndolo a un matraz de 500 o 100 ml según el caso, con el fin de aumentar o disminuir la disponibilidad de oxígeno. Los resultados se muestran en la tabla 19.

**TABLA 16. EFECTO DE CONDICIONES DE AIREACION EN LA PRODUCCION DE ALGINATO POR A. vinelandii MUTADA 9046-2 EN BAJA VELOCIDAD DE AGITACION EN MATRACES AGITADOS**

VOLUMEN ml	pH FINAL	SACAROSA RESIDUAL g/l	DENSIDAD OPTICA	VISCOSIDAD RELATIVA
50	5.0	9.15	10.50	3.79
250	6.5	19.43	1.65	1.00
100*500	6.4	14.76	1.92	1.06
500*100	6.1	10.76	12.21	1.41

Temperatura 30°C  
 Concentración de MOPS 25mM  
 Agitación lenta 60 rpm  
 Tiempo de fermentación 72 h  
 Volúmenes de fermentación variables, 50 ml, 250 ml, cambio de matraz de 100 a matraz de 500 ml y viceversa, aproximadamente a la mitad del tiempo de fermentación.

**TABLA 19. EFECTO DE CONDICIONES DE AIREACION EN LA PRODUCCION DE ALGINATO POR A. vinelandii MUTADA 9046-2 EN ALTA VELOCIDAD DE AGITACION EN MATRACES AGITADOS**

VOLUMEN ml	pH FINAL	SACAROSA RESIDUAL g/l	DENSIDAD OPTICA	VISCOSIDAD RELATIVA
50	4.9	9.54	13.20	2.29
250	4.9	11.12	11.73	4.04
100*500	4.8	13.09	10.29	2.95
500*100	7.0	16.99	1.20	1.00

Temperatura 30°C  
 Concentración de MOPS 25mM  
 Agitación rápida 100 rpm  
 Tiempo de fermentación 72 h  
 Volúmenes de fermentación variables, 50 ml, 250 ml, cambio de matraz de 100 a matraz de 500 ml y viceversa, aproximadamente a la mitad del tiempo de fermentación.



De la tabla 18 y 19 se desprenden una serie de resultados interesantes: por una parte, los microorganismos que crecieron con agitación lenta presentan una forma alargada al observarse en microscopio, mientras que los de alta velocidad de agitación una forma circular con una capa de alginato notoria al microscopio, como se observa en la figura 9. Por otro lado, los valores extremos de disponibilidad de oxígeno ( 250 ml de medio, agitación lenta y 50 ml de medio agitación rápida) no son condiciones buenas, es decir tanto la limitación como el exceso de oxígeno perjudican el desarrollo del microorganismo, mientras que los puntos intermedios resultan ser las mejores condiciones de trabajo. Estos resultados se ilustran en la figura 9.

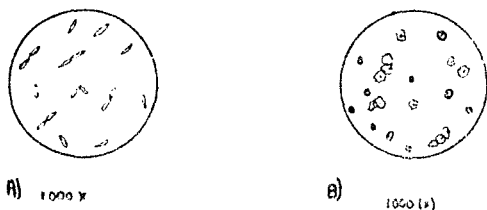


FIGURA 9. A) DESARROLLO DEL MICROORGANISMO A BAJA VELOCIDAD DE AGITACION; B) DESARROLLO DEL MICROORGANISMO A ALTAS VELOCIDADES DE AGITACION.

Con base en los resultados obtenidos en el estudio anterior se realizaron fermentaciones con 50, 100, 150, 200, 250, 300 y 350 ml de medio y con una velocidad de agitación de 200 rpm. Estas condiciones se definieron con base en gráficas donde se reporta la velocidad de transferencia de oxígeno en función del volumen del medio.

TABLA 20. EFECTO DE LA AIREACION EN EL CULTIVO DE A. vinelandii MUTADA 9046-2 EN MATRACES AGITADOS

VOLUMEN DE MEDIO ml	pH FINAL	SACAROSA RESIDUAL g/l	DENSIDAD OPTICA	VISCOSIDAD RELATIVA
50	5.08	8.20	11.10	2.91
100	5.07	12.12	14.76	4.97
150	5.11	12.31	11.64	5.00
200	5.26	12.09	9.06	8.58
250	5.23	11.02	9.72	10.43
300	5.21	12.24	6.48	9.33
350	5.17	12.03	9.66	12.08

Temperatura 30°C

Agitación 200 rpm

Tiempo de fermentación 72 h

Se probaron diferentes volúmenes de fermentación, desde 50 hasta 350 ml de medio en matraz de 500 ml.

Concentración de MOPS 25 mM

La tabla 20 muestra los resultados obtenidos, donde el tiempo de flujo del matraz con 950 ml de medio supera notablemente el de las fermentaciones hasta ahora realizadas. Adicionalmente, la cantidad de biomasa formada no es muy alta, por lo que podemos pensar que bajo estas condiciones se favorece la producción de alginato más que la producción del microorganismo. Para los fines del proyecto, se decidió trabajar con estas condiciones. En la figura 10 se compara la capacidad ocupada en matraces de 500 ml con los valores reportados en la literatura para la velocidad de transferencia de oxígeno. Se constata que las mejores condiciones del proceso corresponden a bajas transferencias de oxígeno.

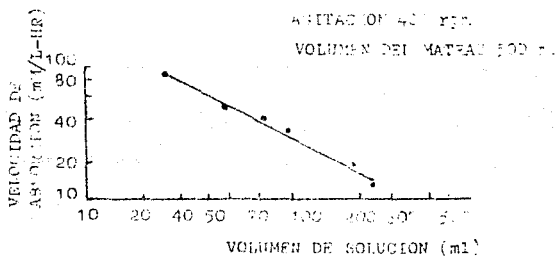


FIGURA 10. TRANSFERENCIA DE OXIGENO EN FUNCION DE LA RELACION VOLUMEN DEL MATRAZ/VOLUMEN DE MEDIO EN MATRACES AGITADOS. (42)



Como se puede observar, en los dos primeros casos se consumió prácticamente toda la sacarosa, mientras que a partir de 11 g/l el consumo de sacarosa no fue total. Sin embargo, se presenta una alta producción de alginato no correlacionada con el consumo. Se puede pensar en posibles errores del método, ya que se obtienen cantidades altas de sacarosa residual y de alginato, que no nos darían el balance teórico. Como conclusión de la tabla 21 se decidió seguir empleando 20 g/l de sacarosa y MOPS para la producción del polímero.

En esta etapa del proyecto se utilizó una nueva serie de cepas mutadas químicamente, por lo que se procedió a compararlas con la cepa de trabajo 9046-3. Los resultados se muestran en la tabla 22.

TABLA 22. COMPARACION DE LA CEPA MUTADA 9046-2 CON CEPAS OBTENIDAS POR MUTACIONES QUIMICAS.

CEPA	pH FINAL	SACAROSA RESIDUAL g/l	DENSIDAD OPTICA	VISCOSIDAD RELATIVA
9046-2	6.5	10.67	7.86	28.22
9046-B	6.2	12.16	11.51	60.41
9046-C	6.3	12.03	8.70	3.75
9046-F	5.4	11.57	11.40	65.82
12518-D	6.6	16.05	3.36	1.20
12518-E	6.6	16.49	3.09	1.12

Cepa Agrobacter vinelandii 9046-2  
 Temperatura 30°C Agitación 200 rpm  
 Tiempo de fermentación 72 h  
 Volumen de fermentación 350 ml de medio/matraz de 500ml  
 Concentración de MOPS 25 mM

Después de realizar las comparaciones que se muestran en la tabla 22, se decidió trabajar la cepa 9046-F que presentaba el mayor tiempo de flujo y buenas propiedades del alginato para precipitar con 2-propanol y para gelificar con  $Ca^{++}$ . Por lo anterior se definió a la cepa 9046-F como la mejor de todas las generadas por vía mutagénica en cuanto a productividad y calidad del polímero obtenido.

Se realizó también una curva de crecimiento del microorganismo para observar en que fase de su crecimiento se presentaba la producción del polímero.

La cinética del proceso se muestra en la tabla 23.

TABLA 23. CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE Azotobacter vinelandii  
CEPA 9046-2.

TIEMPO HORAS	pH FINAL	SACAROSA RESIDUAL g/l	DENSIDAD ÓPTICA	VISCOSIDAD RELATIVA
00	7.11	20.34	0.24	1.02
06	7.10	19.74	0.27	1.02
22	6.64	17.25	1.20	1.08
25	6.57	17.19	2.34	1.12
28	6.52	17.22	4.59	1.16
31	6.65	16.38	5.91	1.33
49	6.51	14.84	12.31	3.12
52	6.40	14.50	13.65	2.95
55	6.38	12.46	12.53	3.95
72	6.09	9.32	14.61	20.00
78	5.99	8.43	17.97	34.41
94	5.75	6.72	16.20	57.12

Temperatura 30°C                      Agitación 200 rpm  
Volumen de fermentación 250 ml de medio/aztrex 500 ml  
Concentración de MOPS 25 mM

Se presentó una disminución de azúcares y aumento de densidad óptica proporcionales, sin embargo el aumento de la viscosidad se presentó entre las 55 y 72 horas de fermentación, por lo que se pensaría en producción de polímero cuando el microorganismo se encuentra cerca de la fase estacionaria, como se muestra en la figura 11.

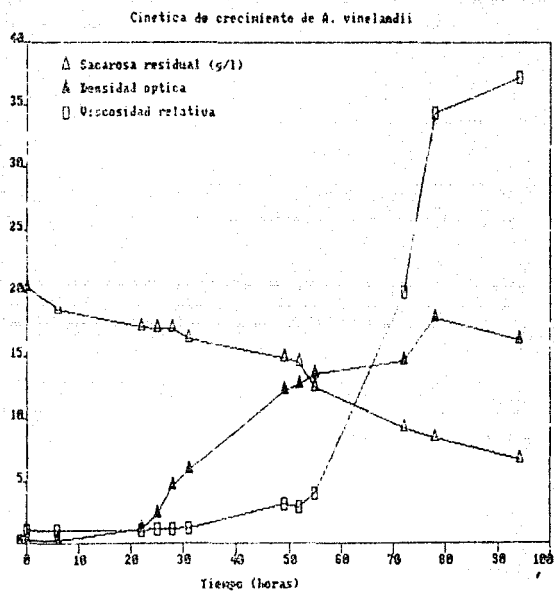


FIGURA 11. CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE Azotobacter  
vinelandii CEPA 9046-2





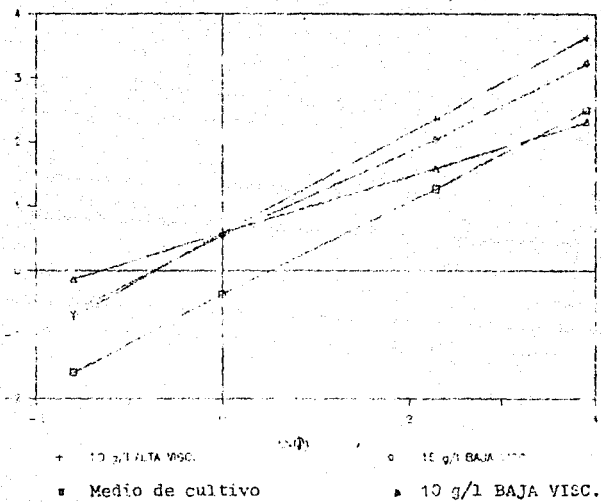


FIGURA 12. GRAFICA DEL ESTUDIO REOLOGICO DE LA CEPA SELECCIONADA (9046-F), CON ALGINATOS COMERCIALES DE ALTA Y BAJA VISCOSIDAD

## FERMENTACIONES EN EQUIPO LH 2000 SERIE I

Con el fin de afinar las condiciones del proceso se realizaron una serie de fermentaciones con diferentes velocidades de agitación y aireación en un Fermentador LH 2000 Serie I con una capacidad de 5 litros, donde se trato de mantener la relación volumen del medio / volumen del recipiente, que se tenía en el matraz.

En la primera fermentación, cuya evolución se muestra en la tabla 25 se observa un desarrollo lento del microorganismo con una baja producción de alginato; durante la fermentación se suspendió la aireación del medio, sin embargo, no se favoreció la producción de alginato. Se decidió entonces disminuir la agitación y no airear.



TABLA 26. FERMENTACION No.2 EQUIPO LH1  
 AGITACION 400 RPM - SIN AIRE

TIEMPO (HORAS)	DENSIDAD OPTICA	VISCOSIDAD
00	0.02	1.06
07	0.06	---
21	0.08	---
27	0.08	---
31	0.10	---
47	0.74	---
51	0.94	---
55	0.98	---
63	1.18	---
70	1.26	---
90	1.20	---
SE AUMENTO LA AGITACION A 650 rpm		
113	3.81	1.20

II Cepa 9046-2  
 Volumen del medio 4 l

Temperatura 30°C  
 pH 7.2 ajustado con NaOH

En el caso de la fermentación reportada en la tabla 27 se incremento la agitación y la aireación obteniéndose una densidad óptica, biomasa y consumo de NaOH altos, por lo que se puede pensar que las condiciones favorecieron al desarrollo del microorganismo, pero no así la producción de alginato.

TABLA 27. FERMENTACION NO. 3 EN EQUIPO LH:  
 AGITACION 700 RPM AIREACION 1000 ml/min

TIEMPO (HORAS)	DENSIDAD OPTICA	ml NaOH GASTADO	VISCOSIDAD
00	2.31	00	1.04
14	2.64	80	---
18	4.20	25	---
21	9.12	30	---
29	11.67	16	1.20
38	12.36	00	---
42	11.76	00	---
47	11.37	00	---
62	11.28	00	---
65	11.76	00	1.29

III Cepa 9046-2  
 Volumen del medio 4 l

Temperatura 30°C  
 pH ajustado con NaOH 0.5 N

En la tabla 28, se presenta otra fermentación en la que se mantuvo alta la agitación a una muy baja aireación. El desarrollo del microorganismo y la producción de alginato favorable en comparación con las anteriores. Después de 45 horas de fermentación se suspendió el aire sin obtener ventajas para la producción de alginato.

TABLA 28. FERMENTACION No. 4 EN EQUIPO LH.

AGITACION 800 RPM      AIREACION 120 ml/min

TIEMPO (HORAS)	DENSIDAD OPTICA	NaOH ml	VISCOSIDAD
00	1.20	00	1.20
38	28.47	160	2.91
42	32.46	00	2.95
45	27.48	00	2.93
SE APAGO EL SUMINISTRO DE AIRE			
63	17.94	14	2.93

IV Cepa 9046-2  
Volumen del medio 4 l

Temperatura 30°C  
pH ajustado con NaOH 1 N

En la tabla 29 se presenta otro intento con una mayor agitación. Se observa un ligero desarrollo del microorganismo, probablemente ocupando el poco oxígeno disponible en el medio. A las 52 horas de fermentación se proporcionó aire al medio y se presentó un aumento en la densidad óptica, pero no así en la viscosidad del medio. De esta prueba y la anterior cabe destacar que en base a las fermentaciones en matraz la cantidad de oxígeno disponible era prácticamente cero, pero como se observa es necesario una cantidad mínima, para el desarrollo del microorganismo.

TABLA 29. FERMENTACION No. 5 EN EQUIPO LH.

AGITACION 900 RPM SIN AIRE

TIEMPO (HORAS)	DENSIDAD OPTICA	ml NaOH GASTADOS	VISCOSIDAD
00	1.2	00	1.16
14	1.71	40	----
19	2.22	00	----
23	2.34	00	1.20
28	2.07	00	----
43	2.04	00	1.20
SE ABRIO EL SUMINISTRO DE AIRE *			
52	2.97	00	1.35
60	9.90	120	1.41
75	10.17	10	1.41

\* El suministro de aire era de 100 ml/ min.  
 V Cepa 9046-2                      Temperatura 30°C  
 Volumen del medio 4 l              pH ajustado con NaOH 1 N



TABLA 30. FERMENTACIONES 6, 7, 8 Y 9 EN EQUIPO LH

TIEMPO FERMENT (HORAS)	AGITACION RPM	AIREACION ml/min	VISCOSIDAD	DENSIDAD OPTICA
I 56	450	600	1.25	1.65
II 31	600	2000	1.29	5.1e
III 111	200	2000	1.41	6.75
IV 140	200	100	1.10	11.10

Cepa 9046-2

Temperatura 30 C

Volumen de medio 4l

Concentración de MOPS 25 mM

Todas las condiciones anteriores resumidas en la tabla 30, no generaron resultados satisfactorios. A pesar de probar diferente relaciones aire/agitación; diferentes concentraciones de NaOH para ajustar el pH (pensando en que probablemente afectara la fermentación).

Posteriormente se pensó que el tipo de agitación podía afectar la fermentación, pero se realizó una fermentación en matraces con un agitador magnético y se obtuvieron buenos resultados por lo que se piensa que no se ha logrado encontrar el punto óptimo de relación agitación-aireación encontrado en los matraces de fermentación.

#### 4. CONCLUSIONES

Con base en los resultados de los experimentos realizados se puede concluir lo siguiente:

- la mejor fuente de carbono para la fermentación es la sacarosa, a una concentración de 20 g/l con el uso de MOPS,

- es indispensable la presencia de fosfatos para el buen desarrollo del microorganismo y producción de alginato,

- el uso de MOPS para regular pH favorece el rendimiento del producto, ya que mantiene el medio en el pH óptimo del microorganismo para producir alginato,

- la presencia de nitrógeno en el medio no presenta ninguna ventaja para la producción de alginato, (ya que el microorganismo es capaz de fijarlo del ambiente).

- tanto las mutaciones químicas como las realizadas con luz UV mejoran la producción de alginato, que posee la cepa silvestre, además de mejorar la calidad del polímero obtenido. De las once cepas mutantes probadas, la mejor fue la 9046-F que produce aproximadamente 80 veces la viscosidad de las cepas silvestres y que al compararla con soluciones de alginatos comerciales, presenta un comportamiento cercano al de concentraciones de 10 y 15 g/l

- la cantidad de oxígeno, determinada por la relación agitación /aireación tiene un efecto muy importante en la producción de alginato, ya que tanto el exceso como la limitación de oxígeno presentan desventajas en la producción de alginato,

- en cuanto a la relación volumen del medio / volumen del matraz, se presentan condiciones de transferencia de oxígeno cercanas a cero, y
- la relación agitación-aireación es el parámetro más importante para favorecer el desarrollo del microorganismo y por lo tanto la producción de alginato.

El uso de cepas mutadas nos lleva a tener un lote de cepas hiperproductoras que proporcionen concentraciones relativamente altas de producto y que además mejoran sus propiedades, por lo que se puede pensar en que son una buena fuente de obtención de alginato, alternativa muy interesante para la Industria Alimentaria, lo cual hace uso variado de las diferentes gomas existentes.

Para complementar el presente trabajo es necesario realizar estudios sobre el escalamiento del proceso que incluyan la sensibilidad de la cepa al oxígeno y la agitación mecánica, así como la estabilidad de la cepa, causas por las que los resultados obtenidos a escala laboratorio no fueron reproducidos en escalas de 5 litros.

Finalmente señalaremos que los objetivos planteados se lograron satisfacer, ya que se encontraron las condiciones óptimas de fermentación y se obtuvo una goma con las características deseadas.

## BIBLIOGRAFIA

1. Annison, G. y Couperwhite, I. Effect of limiting substrate concentration, growth rate and aeration on alginate composition and production by Azotobacter vinelandii in continuous culture. Food Hydrocolloids. Vol. 1, No. 2, 1986, pp 101-111
2. Arp, J. Daniel. Effects of alcohols on the reactivity and estabiltiy of Azotobacter vinelandii hidrogenase. Archives of Biochemistry and Biophysics. Vol. 261, No. 1, 1988, pp 35-43
3. Badui, Dergal S. Química de Alimentos. Alhambra, Mexicana. 1981
4. Baird, J.K.; Sandford, P.A. y Cottrell, I.N. Industrial applications of some new microbial polysaccharides. Biotechnology. November 1983
5. Biología Alimentaria. Apuntes del Curso de Biología alimentaria. PUAL. Octubre 1987
6. Blackwell, John. Infrared and Raman Spectroscopy of Polysaccharides. Extracellular Microbial Polysaccharides
7. Blanchard, J.A.V. y Mitchell, J.R. Polysaccharides in Food. Butterwarths. 1979
8. Brivonese, A.C. y Sutherland, W.I. Polymer production by a mucoid strain of Azotobacter vinelandii in batch culture. Applied Microbiology Biotechnology. Vol. 30, 1989, pp 97-103
9. Buks, Christopher; Deavin, Lynda; Lawson, Christopher y Pindar, David. The production of Industrially Important Bacterial polysaccharides. Biochemical Society Transactions

10. Buke, Christopher y Pindar, David. The biosynthesis of alginic acid by Azotobacter vinelandii. Biochem. J. 1970 No. 152, pp 617-622
11. Chapman and Chapman V.J. Seaweeds and their uses. Chapman and Hall. London-New York. 1980
12. Deavin, L.; Jarman, T.R.; Lawson, C.J.; Righelato, R.C. y Slocombre, S. The production of alginic acid by A. vinelandii in batch and continuous culture. ACS Symp. Ser. No. 45 1977
13. Deretic, V; Grill, J.F. y Chakrabarty, A.M. Alginate Biosynthesis: a model system for gene regulation and function in Pseudomonas. Biotechnology Vol. 5, May, 1987, pp 469-477
14. Goldberg, Joanne and Ohman, Dennis. Construction and characterization of Pseudomonas aeruginosa algB mutants; role of algB in high-level production of alginate. Journal of bacteriology. April 1987, Vol. 169, No. 4, pp 1593-1602
15. Gorin, P.A. and Spencer, J.F. Exocellular alginic acid from A. vinelandii. Canadian Journal of chemistry. Vol. 44, 1966
16. Graham, Horace D. Food Colloids The Avi Publishing Company Inc. Westport, Connecticut 1977
17. Haug, Arne y Larsen Bjorn. Quantitative determination of the uronic acid composition of alginates. Acta Chemica Scandinavica No. 16, 1962, pp 1908-1918

18. Harlander, Susan y Labuza, Theodore. Biotechnology in Food processing. Noyes Publications, Park Ridge, New Jersey, U.S.A.
19. Hoffman, Pauls; M.Irwin, Richard; Carneira, C.A.; Morgan, T.V.; Ensley, D.B y V.Dervartanian, Daniel. Studies of photochemical action spectra on N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine-oxidase-negative mutants of A. vinelandii. Eur. J. Biochem. No. 105. 1980, pp 177-185
20. Hoffman, Pauls; Morgan, T.V. y V.Dervartanian, Daniel. Respiratory chain characteristics of mutants of A. vinelandii. Eur. J. Biochem. No. 100. 1979, pp 19-27
21. Moran, Nigel; Jarman, R.T. y Dawes, Edwin. Effects of carbon source and inorganic phosphate concentration on the production of alginate acid by a mutant of A. vinelandii and on the enzymes involved in its biosynthesis. Journal of General Microbiology, No. 127. 1981, pp 185-191
22. Jarman, T.R.; Deavin, L.; Slocombe, B. y Righelato, R.C. Investigation of the effect of environmental conditions on the rate of exopolysaccharide synthesis in A. vinelandii. Journal of General Microbiology, No. 107. 1978, pp 59-64
23. Jarman, T.R. y Pace, G.W. Energy requirements for microbial exopolysaccharide synthesis. Archives of Microbiology. No. 137, 1984, pp 231-235
24. Kelco Specialty Colloids. Kelco Division of Merk & Co. Inc. Alginate for emulsifying, thickening,



suspending and stabilizing food products. Technical Bulletin F-40

25. Keng and Chattr. Food Biotechnology New and modified polysaccharides. No. 198

26. Kuhla, J. y Oelze, J. Dependency of growth yield, maintenance and ks-values on the dissolved oxygen concentration in continuous cultures of A. vinelandii. Archives of microbiology. No. 149, 1988, pp 509-514

27. Larsen, B. y Haug, A. Biosynthesis of alginate Carbohydrate research. No. 17, 1971, pp 287-290

28. Lawrence, A.A. Edible gums and related substances. Noyes Data Corporation. New jersey, 1973

29. Lawson, Christopher J. Production of industrially important gums with particular reference to xanthan gum and microbial alginate. ACS Symp-Ser. No. 41, 1977, pp 282-296

30. Les polysaccharides. Dossier. Biofutur. September 1986

31. McComb, E.A. y McCready, R.H. Determination of acetyl in pectin and in acetylated carbohydrate polymers Analytical chemistry. Vol. 29, No. 5, May 1957

32. McInerney, Michael; Holmes, K.S.; Hoffman, Paul y V.Dervartanian, Daniel. Respiratory mutants of A. vinelandii with elevated levels of cytochrome d. Eur. J. Biochem No. 141, 1984, pp 447-452

33. Mian, F.A.; Jarman, R.T. y Righelato, R.C. Biosynthesis of exopolysaccharide by Pseudomonas

aeruginosa. Journal of bacteriology. Vol. 134. No. 2. May 1978, pp 418-422

34. N.Moo-Young. Comprehensive biotechnology. Microbial polysaccharides. Vol. 3, No. 49

35. Okabe, Eri; Nakajima, Mutsuyasu; Murooka, Harugoshi y Nisizawa, Kazutosi. Investigation of carbon and phosphorus sources in cultural media of a selected strain of alginate-producing A. vinelandii. J. Ferment. Technol.; Vol. 59. No. 1, 1981, pp 1-7

36. Pace, Gary W. y Righelato, Renton C. Production of extracellular microbial polysaccharides. Adv. Biochem. Eng. Vol. 15, 1980, pp 41-70

37. Patente No. 7715665. Demande de Brevet D'Invention. Procéde pour la production d'un polysaccharide. Republique Francaise. Institut National de La propriete Industrielle. Paris

38. Penman, A. y Sanderson. G.R. A method for the determination of uronic acid sequence in alginates. Carbohydrate research. No. 25, 1972. pp 273-282

39. Quintero Ramirez, Rodolfo. Cospilador. Prospectiva de la Biotecnología en México. Fundación Javier Harriros Sierra, A.C. Conacyt. Septiembre 1985

40. San Ford, Paul; Cottrell, Ian and Pettitt, David. Microbial polysaccharides (New products and their applications). Pure & Appl. Chem. Vol. 56, No. 7, 1984, pp 879-882

41. Smith, Ian y Pace, Gary. Recovery of microbial polysaccharides. J. Chem. Tech. Biotechnol. Vol. 32,

1982, pp 119-129

42. Strandberg, G.W. y Wilson, P.W. Formation of the nitrogen-fixing enzyme system in A. vinelandii. Canadian Journal of Microbiology. Vol. 14, No. 25, 1968

43. Sutherland, I.W. Microbial exopolysaccharide synthesis. Extracelullur microbial polysaccharides.

44. Tit-Yee Wong. Effects of mannose on the growth of N -fixing A. Vinelandii. Arriud and environmental microbiology. Vol. 54, No. 2. 1988, pp 473-475

45. Wang I. C., Daniel. Fermentation and enzyme technology John Wiley & Sons. New York. 1979, pp 179-182

46. Wedlock, J.David; Faasihuddin, Badruddin A y Phillips, G.O. Factor influencing the molecular weight of sodium alginate preparations. Food hydrocolloids. Vol. 1, No. 3, 1987, pp 207-213