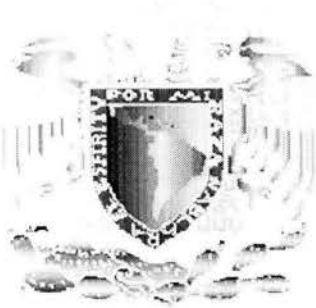


00551

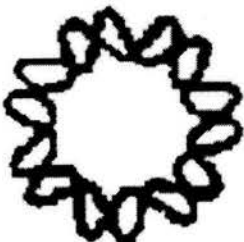


**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**"Producción de alginatos a bajas velocidades
específicas de crecimiento de *Azotobacter
vinelandii*"**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS
P R E S E N T A:
Q.F.B. RUBÉN PRIEGO JIMÉNEZ



Cuernavaca, Morelos, Noviembre 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Enrique Galindo. Durante la realización de este trabajo, se contó con el apoyo económico de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) a través del proyecto IN 218201.

ÍNDICE GENERAL

	Página
Índice General	i
Índice de Figuras	iv
Índice de Tablas	vi
Nomenclatura	vii
Resumen	1
Capítulo I. Introducción	2
Capítulo II. Antecedentes	5
2.1 Alginatos	5
2.1.1 Alginatos algales	7
2.1.2 Alginatos de origen bacteriano	7
2.2 Función biológica del alginato microbiano	8
2.3 Aplicaciones de los alginatos	10
2.4 Generalidades de <i>Azotobacter vinelandii</i>	11
2.4.1 Biosíntesis de alginato en <i>A. vinelandii</i>	12
2.5 Factores que influyen en la biosíntesis del alginato producido por <i>A. vinelandii</i> en cultivos en lote	12
2.6 Cultivos continuos de <i>A. vinelandii</i> y otros microorganismos	17
2.7 Cultivos exponencialmente alimentados	20
Capítulo III. Hipótesis y Objetivos	22
3.1 Hipótesis	22

3.2 Objetivo general	22
3.3 Objetivo específico	22
Capítulo IV. Materiales y Métodos	23
4.1 Cepa, medio de cultivo y condiciones de crecimiento	23
4.2 Cultivos en lote	24
4.3 Cultivos exponencialmente alimentados (<i>CEA</i>)	25
4.4 Métodos Analíticos	26
4.4.1 Determinación de biomasa por gravimetría	26
4.4.2 Determinación de biomasa por turbidimetría	28
4.4.3 Determinación de sacarosa por el método cromatográfico	28
4.4.4 Extracción y cuantificación de alginato	30
4.4.5 Distribución de pesos moleculares	30
4.5 Cálculo de parámetros cinéticos y estequiométricos	32
4.6 Análisis matemático para cultivos exponencialmente alimentados	33
Capítulo V. Resultados y Discusión	35
5.1 Cultivo en Lote	35
5.2 Cultivos Exponencialmente Alimentados (<i>CEA</i>)	36
5.2.1 <i>CEA</i> ($\mu = 0.09 \text{ h}^{-1}$)	38
5.2.2 <i>CEA</i> ($\mu = 0.06 \text{ h}^{-1}$)	43
5.2.3 <i>CEA</i> ($\mu = 0.03 \text{ h}^{-1}$)	45
Capítulo VI. Conclusiones y Recomendaciones	55
6.1 Conclusiones	55

6.2 Recomendaciones	56
Capítulo VII. Bibliografía	57
Anexos	65

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 2.1 Estructuras secundarias del ácido algínico.	5
Figura 2.2 Estructuras de alginato algal y bacteriano. M, ácido manurónico; G, ácido gulurónico; OAc, grupo acetil.	6
Figura 2.3 Ruta de biosíntesis de alginato en <i>A. vinelandii</i> , Sabra <i>et al.</i> 1999.	13
Figura 2.4 Efecto de la tasa de dilución en la producción de biomasa y alginato producido por <i>A. vinelandii</i> en cultivos continuos, Annison y Couperwhite, 1986.	18
Figura 2.5 Efecto de la tasa de dilución en la producción de alginato producido por <i>P. mendocina</i> y conversión de glucosa a producto en cultivos continuos, Sengha <i>et al.</i> (1989).	19
Figura 4.1 Sistema de fermentación, control y adquisición de datos para cultivos exponencialmente alimentados.	27
Figura 4.2 Curva patrón para la determinación de biomasa por turbidimetría.	29
Figura 4.3 Curvas patrón para la determinación de sacarosa por HPLC.	31
Figura 5.1 Producción de alginato por <i>A. vinelandii</i> SML2 en cultivo en lote. (a) Concentración celular y consumo de sacarosa; (b) Producción de alginato y evolución de pH; (c) Control de TOD y porcentaje de apertura de la válvula de oxígeno	37
Figura 5.2 Producción de alginato en cultivos exponencialmente alimentados a una $\mu = 0.09 \text{ h}^{-1}$. (a) Concentración de biomasa y μ puntual; (b) Concentración de alginato y sacarosa.	39
Figura 5.3 TOD y concentración de oxígeno en el gas de entrada (a); Incremento de volumen y comportamiento del pH (b), en cultivos exponencialmente alimentados a una $\mu = 0.09 \text{ h}^{-1}$.	40
Figura 5.4 Distribuciones del peso molecular del alginato producido por <i>A. vinelandii</i> SML2 en el CEA a 0.09 h^{-1} : (—) 6 h, (••••) 15 h, (----) 27 h.	42

Figura 5.5	Producción de alginato en cultivos exponencialmente alimentados a una $\mu = 0.06 \text{ h}^{-1}$. (a) Concentración de biomasa y μ puntual; (b) Concentración de alginato y sacarosa.	44
Figura 5.6	Distribuciones del peso molecular del alginato producido por <i>A. vinelandii</i> SML2 en el CEA a 0.06 h^{-1} : (—) 6 h, (••••) 15 h, (----) 27 h.	45
Figura 5.7	Producción de alginato en cultivos exponencialmente alimentados a una $\mu = 0.03 \text{ h}^{-1}$. (a) Concentración de biomasa y μ puntual; (b) Concentración de alginato y sacarosa.	46
Figura 5.8	Distribuciones del peso molecular del alginato producido por <i>A. vinelandii</i> SML2 en el CEA a 0.03 h^{-1} : (—) 6 h, (••••) 15 h, (----) 27 h.	47
Figura 5.9	Distribuciones del peso molecular del alginato producido por <i>A. vinelandii</i> SML2 en cultivo en lote y los tres CEA's realizados: (—••—) 0.21 h^{-1} (lote); (—) 0.09 h^{-1} ; (••••) 0.06 h^{-1} ; (----) 0.03 h^{-1} .	48
Figura 5.10	Relación del alginato sintetizado con base en biomasa en CEA's (•) de <i>A. vinelandii</i> SML2 como función de la μ .	49
Figura 5.11	PMP _M de alginato producido por <i>A. vinelandii</i> SML2 en CEA's (•) como función de la μ .	52

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 2.1 Propiedades funcionales y usos industriales de los alginatos	10
Tabla 5.1 Resumen de los parámetros cinéticos obtenidos en este trabajo para las diferentes condiciones de cultivo evaluadas.	50

NOMENCLATURA

A	Constante fijada arbitrariamente (velocidad específica de crecimiento)
<i>Alg_A</i>	Alginato producido en la etapa de alimentación (g/L)
<i>Alg_L</i>	Alginato producido en la etapa en lote (g/L)
ATCC	American Type Culture Collection
D	Tasa de dilución (h ⁻¹)
F	Flujo (mL/h)
G	Ácido gulurónico
K_O	Constante de saturación por oxígeno disuelto (% de TOD)
K_S	Constante de saturación por sustrato (g/L)
M	Ácido manurónico
MOPS	Ácido 3-N-morfolino propanosulfónico
PHB	Polihidroxibutirato
PM	Peso molecular (KDa)
PMP_M	Peso molecular promedio máximo (KDa)
S	Concentración de sustrato limitante (g/L)
rpm	Velocidad de agitación (revoluciones por minuto)
TOD	Tensión de oxígeno disuelto
VVM	Volumen de aire por volumen de medio por minuto
Y_{P/X}	Rendimiento de producto en base a biomasa (g alginato/g células p.s.)
Y_{P/X}'	Relación másica entre el alginato producido y biomasa generada en la etapa de alimentación exponencial
μ	Velocidad específica de crecimiento

RESUMEN

La producción de alginato por vía microbiana usando cepas de *Azotobacter vinelandii* presenta potencial para ser implementada a nivel comercial, ya que éstos procesos pueden ser manipulados para la obtención de un producto con características químicas determinadas. Sin embargo, debido a los bajos rendimientos hasta ahora obtenidos y a la variabilidad del peso molecular promedio máximo (PMP_M) del biopolímero sintetizado, este proceso no ha logrado constituirse en una alternativa económicamente viable, comparado con el material extraído de las algas cafés. Con el propósito de evaluar la producción de alginato y de esta manera poder optimizar el proceso de fermentación se han realizado numerosos estudios sobre la síntesis de alginato por *A. vinelandii*, en cultivos en lote y en continuo, sobre la influencia de diversos parámetros ambientales. De la gama de factores estudiados en el cultivo de *A. vinelandii* (tanto en matraces como en fermentador), se ha observado que la velocidad específica de crecimiento (μ) puede jugar un papel clave en la síntesis de alginato. Sin embargo, no se ha estudiado el efecto de μ sobre funciones objetivo tales como el rendimiento de alginato con base en biomasa ($Y_{P/X}$) y PMP_M del alginato sintetizado.

En el presente trabajo, el cultivo exponencialmente alimentado (*CEA*) fue utilizado para determinar el efecto de μ sobre el PMP_M y $Y_{P/X}$ en cultivos de *A. vinelandii* SML2. Esta cepa contiene una mutación que la hace incapaz de producir alginasas (enzimas que degradan el alginato), haciendo de ella una excelente herramienta para evaluar el efecto de μ sobre el PMP_M del alginato sintetizado durante el cultivo. Por otra parte, ya que en recientes investigaciones se ha demostrado que los componentes presentes en el caldo de cultivo agotado del inóculo desempeñan un importante papel regulador en la biosíntesis y en las características químicas del alginato producido en cultivos en biorreactor, los *CEAs* realizados en este trabajo fueron inoculados con células previamente centrifugadas y resuspendidas en medio de cultivo nuevo, para facilitar la interpretación de los datos obtenidos con respecto a la biosíntesis de alginato. Los *CEAs* fueron alimentados con una solución concentrada de sacarosa usando una bomba peristáltica de precisión. Las μ de los *CEAs* fueron manipuladas en el intervalo de 0.03-0.09- h^{-1} . El estado pseudo-estacionario se logró cuando la concentración de sustrato y la μ fueron constantes en el cultivo (~ 8-25 h).

El $Y_{P/X}$ y el PMP_M se incrementaron conforme la μ de *A. vinelandii* fue menor (en el intervalo de 0.03 -0.06 h^{-1}). El $Y_{P/X}$ y el PMP_M fueron 3 y 15 veces mayores, respectivamente, con respecto a cultivos desarrollados a μ típicas del cultivo en lote (~ 0.22 h^{-1}). Estos resultados sugieren que *A. vinelandii* sintetiza alginatos de alto PMP_M como una respuesta de adaptación a condiciones ambientales que limitan el crecimiento. El $Y_{P/X}$ y PMP_M del alginato sintetizado están determinados por la velocidad específica de crecimiento de *A. vinelandii*, efecto que es particularmente pronunciado a μ 's bajas. En consecuencia, condiciones de cultivo que minimicen μ podrán ser usadas para obtener alginatos con alto rendimiento y elevado peso molecular.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Un número importante de microorganismos sintetizan polisacáridos como componentes estructurales de su pared celular o como macromoléculas extracelulares (exopolisacáridos). Se han caracterizado una gran cantidad de exopolisacáridos con propiedades atractivas para una potencial aplicación industrial, siendo las bacterias la fuente microbiana de preferencia debido a su fácil manejo en el laboratorio. Por mencionar algunos ejemplos, entre estos biopolímeros encontramos a la goma xantana producida por *Xanthomonas campestris*, la cual tiene amplio uso en la industria de alimentos, la goma gelana de *Auromonas elodea* y el alginato, los cuales se usan como agentes gelificantes.

El alginato es un copolímero de ácido α -D-manurónico y su epímero, el ácido β -D-gulurónico, el cual es utilizado como agente gelificante, espesante, y emulsificante en las industrias farmacéutica, alimentaria, textil y del papel (Sutherland, 1990; Sabra *et al.* 2001). Los alginatos comerciales son extraídos de algas marinas tales como *Laminaria* y *Macrocystis*. La composición de sus bloques depende de la especie usada, de las condiciones ambientales de cultivo y del método de extracción (Anninon y Couperwhite, 1986). Actualmente, en el ámbito mundial se producen más de 40,000 toneladas al año de este polímero con fines comerciales (McHugh, 2002). Otra fuente importante para la obtención de estos biopolímeros son algunas especies bacterianas, principalmente de *Azotobacter vinelandii* y varias especies de *Pseudomonas* (Ertesvåg *et al.* 1996).

Azotobacter vinelandii es una bacteria que produce alginatos similares a los alginatos algales (Skjåk-Braek, 1992; Ertesvåg *et al.* 1996). El alginato producido por *A. vinelandii* tiene potencial para ser implementado a nivel comercial. Sin embargo, debido a los bajos rendimientos hasta ahora obtenidos y a la variabilidad de PMP_M , este proceso no ha logrado constituirse en una alternativa económicamente viable, comparado con el material extraído de las algas cafés (Sutherland y Tait, 1994).

Se han realizado estudios sobre la influencia de factores nutricionales y parámetros ambientales en la producción de alginato y crecimiento de *A. vinelandii*, en cultivos en lote, de los cuales Horan *et al.* (1981), Brivonese y Sutherland (1989) han estudiado los efectos del tipo y cantidad de la fuente de carbono, nitrógeno y fosfatos. Kuhla y Oelze (1988), Peña *et al.* (2000) y Trujillo-Roldán *et al.* (2001) han evaluado el efecto de la concentración de oxígeno disuelto. De estos factores estudiados en cultivos de *A. vinelandii* se ha observado que la tensión de oxígeno disuelto (TOD) es uno de los principales parámetros en la producción de alginato en cultivos, tanto en matraces como en fermentador.

Por otro lado, Jarman *et al.* (1978), Jarman (1979), Anninson y Couperwhite (1986), realizaron estudios en cultivo continuo, manipulando la velocidad específica de crecimiento de *A. vinelandii* bajo diferentes condiciones de limitación nutricional. De estos trabajos se ha observado que la tasa de crecimiento de *A. vinelandii* es un parámetro cinético importante en términos de la concentración de alginato producido por el microorganismo, concluyendo que tasas de crecimiento bajas incrementan la

concentración de alginato. Sengha *et al.* (1989) reportaron –en cultivo continuo- que la producción de alginato por *Pseudomonas mendocina* incrementó al trabajar a tasas de crecimiento bajas ($< 0.1 \text{ h}^{-1}$).

El cultivo exponencialmente alimentado (*CEA*) es una herramienta de investigación usada en el área de producción de polímeros y metabolitos secundarios de origen microbiano, donde ha tenido un papel importante para determinar el efecto de una condición fisiológica sobre las funciones objetivo de los procesos de fermentación. Youssef *et al.* (1999) reportaron la producción de pululanos por *Aureobasidium pullulans* y Ramírez *et al.* (1994) reportaron la producción de penicilina acilasa por *Escherichia coli*, en ambos casos, utilizando cultivo exponencialmente alimentado (*CEA*), se observó una mayor producción del metabolito de interés a bajas μ .

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de bajas velocidades específicas de crecimiento (particularmente $\mu < 0.1 \text{ h}^{-1}$) sobre el $Y_{P/X}$ y el PMP_M utilizando el cultivo exponencialmente alimentado para mantener los cultivos a μ controladas.

CAPÍTULO II

ANTECEDENTES

2.1 ALGINATOS

El alginato es un copolímero extraído de las algas marinas no ramificado compuesto de ácidos β -D-manurónico (M) y su epímero el ácido α -L-gulurónico (G), unidos por enlaces glucosídicos (β 1-4), como se presenta en la *figura 2.1* (Rehm y Valla 1997; Gacesa, 1998). La composición de los bloques M y G pueden variar dependiendo de la especie y de las condiciones de cultivo, tal como se observa en la *figura 2.2* (Sutherland 1990; Gacesa, 1998).

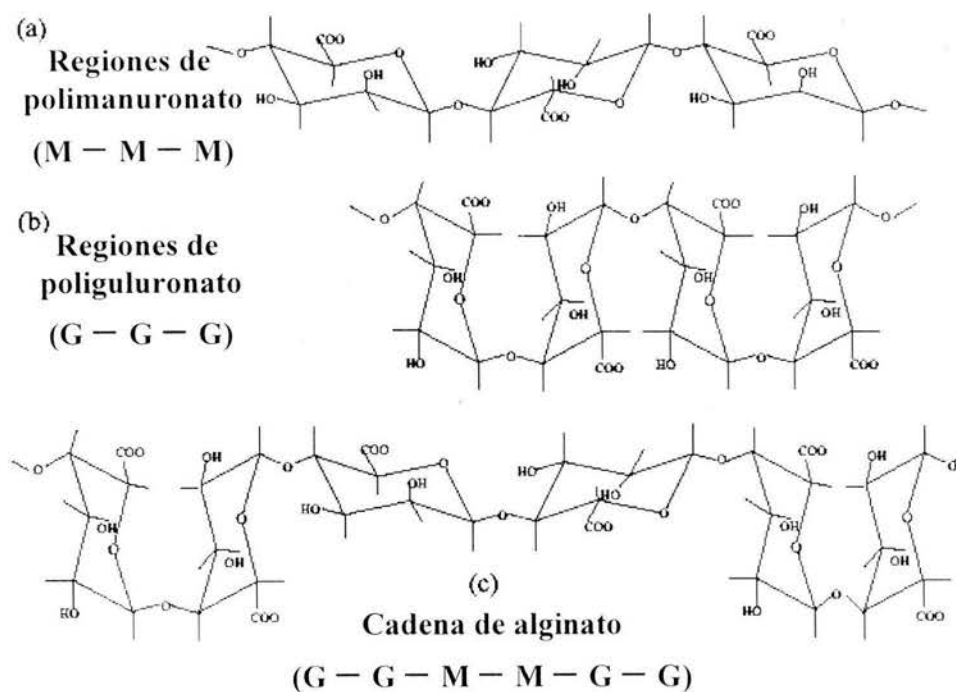


Figura 2.1. Estructuras secundarias del ácido alginico.

Las propiedades fisicoquímicas del ácido alginico son la base de su uso industrial. El alginato, dependiendo de su composición, tiene alta afinidad para unirse a determinados cationes

polivalentes (Moe *et al.* 1995; Rehm y Valla 1997). La solubilidad del alginato en agua está determinada por el pH y la fuerza iónica. Disminuir el pH del medio conduce a una precipitación del alginato. Este biopolímero se puede precipitar y fraccionar utilizando altas concentraciones de sales inorgánicas (Moe *et al.* 1995) como el cloruro de potasio, esto es, modificando la fuerza iónica. El tipo de gel formado que se presenta en las soluciones de alginato depende tanto del número y de la fuerza de las uniones entre las moléculas de alginato como de la composición del polímero. Por ejemplo, cuando en el polímero predominan los bloques de ácidos gulurónicos (G), el gel formado se vuelve completamente rígido y mucho más aún con la presencia de iones calcio. Cuando el biopolímero está compuesto en su mayoría por ácidos manurónicos, la rigidez del gel es menor (Sutherland, 1990; Rehm y Valla, 1997; Clementi *et al.* 1998; Gacesa, 1998).

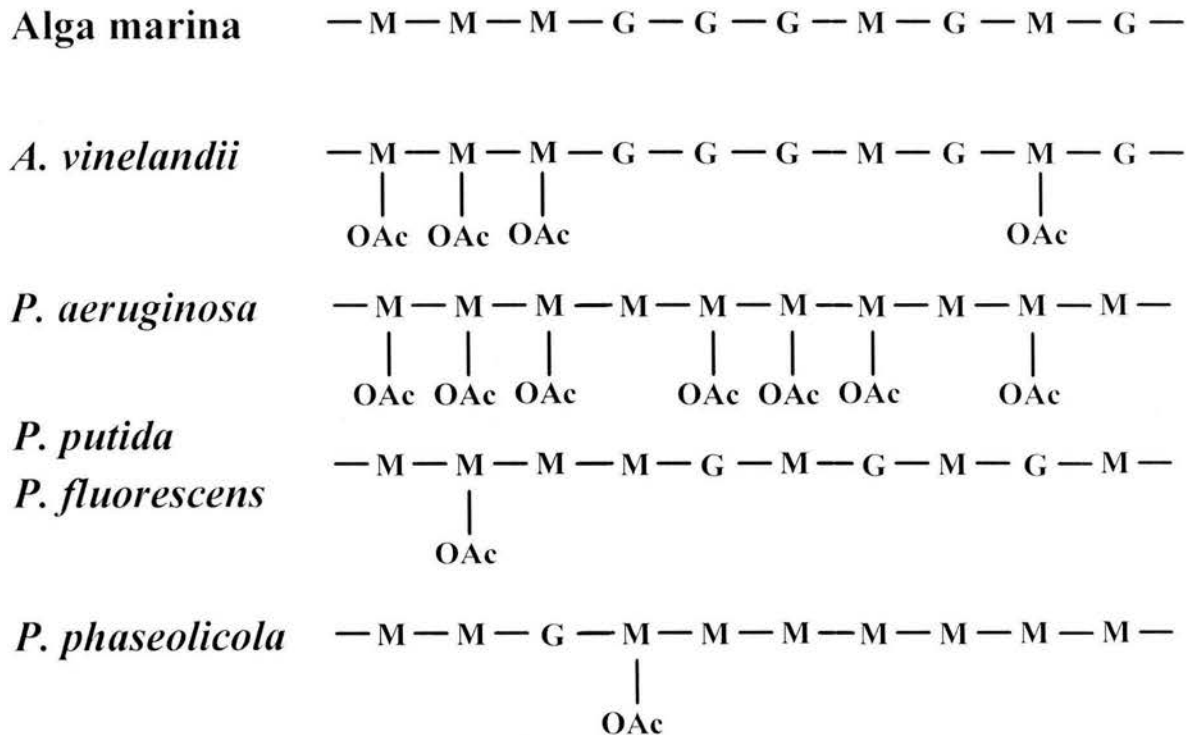


Figura 2.2. Estructuras de alginato algal y bacteriano. M, ácido manurónico; G, ácido gulurónico; OAc, grupo acetil.

2.1.1 Alginatos algales

Los alginatos son los constituyentes de la pared celular de las algas cafés (*Phaeophyceae*). La composición de los bloques del biopolímero obtenido de las algas marinas depende de la especie usada en la extracción y de la parte del tallo de la cual el alginato es extraído. Además, el método de extracción, las condiciones ambientales y de cultivo del alga influyen en la variabilidad de la composición del alginato (Moe *et al.* 1995; Draget *et al.* 2001). El alginato está presente en casi todas las especies de las algas cafés, siendo rentable la extracción del biopolímero en aquellas especies donde el porcentaje del alginato sea mayor a un 40 % en peso (Rehm y Valla, 1997; Gacesa, 1998).

Los principales países productores de alginato son los Estados Unidos (10,000 a 12,000 ton/año), China (8,000 a 10,000 ton/año), Inglaterra (6,000 a 8,000 ton/año), Noruega (5,000 ton/año), Francia (2,000 ton/año) y Japón (1,500 ton/año) (Boswell, 2002). La explotación comercial de algas se practica en México desde hace más de 50 años. Las especies explotadas (*Macrocystis pyrifera*, *Gigartina caniculata* y *Gelidium robustum*) se distribuyen en el pacífico mexicano. Son cosechadas y exportadas en fresco a Estados Unidos para la extracción de alginato. En México solo se industrializa el biopolímero producido por *Gelidium robustum* para la producción de agar (Miranda, 1998; Peña, 1998; Hernández-Carmona *et al.* 1999a, 1999b).

2.1.2 Alginatos de origen bacteriano

Los alginatos de origen microbiano tienen la misma base estructural que los alginatos algales. Difieren en que los alginatos microbianos están acetilados en el carbono dos o tres, en vez de un grupo hidroxilo, como en los alginatos algales. El grado de acetilación de los biopolímeros

bacterianos es variable, donde el alginato producido por *A. vinelandii* presenta un grupo acetilo por ~ 5 residuos de ácidos urónicos (Gorin y Spencer, 1966). Estas acetilaciones están siempre asociadas a los bloques manurónicos (Davidson *et al.* 1977). El alginato producido por *A. vinelandii* está compuesto de ácido manurónico y gulurónico, mientras que el biopolímero producido por *Pseudomonas aeruginosa* no tiene bloques gulurónicos. Estas son características químicas que determinan en gran medida las propiedades del producto (Sutherland, 1990; Gacesa, 1998) (*figura 2.2*).

Es factible que el alginato producido por bacterias deje de ser solo un modelo de estudio del mecanismo de biosíntesis y polimerización y se convierta en un exopolisacárido de valor comercial (Ertesvåg *et al.* 1996). Una de las grandes ventajas de los alginatos bacterianos es su diversidad estructural con respecto a su composición química, ya que se pueden obtener polímeros puros de ácido manurónico (con grandes expectativas en el área de investigación con respecto a inmunoestimulantes), hasta polímeros que contienen el 80 % de residuos gulurónicos (Rhem y Valla, 1997).

2.2 FUNCIÓN BIOLÓGICA DEL ALGINATO MICROBIANO

Se ha sugerido que la generación de una matriz extracelular de exopolisacárido representa una forma de protección del crecimiento microbiano que permite que las células subsistan en ambientes hostiles. La formación de películas con exopolisacáridos conduce a la protección contra una amplia gama de desafíos ambientales, tales como ataque de fagos, limitaciones nutricionales, toxicidad de metales, ambientes ácidos, deshidratación, salinidad y presencia de

agentes antimicrobianos (Stoodley *et al.* 2002). En algunos casos, funcionan como agentes de consumo del exceso de energía en forma de ATP (Sutherland, 1990; Ertesvåg *et al.* 1996; Gacesa, 1998; Wong *et al.* 2000; Espín, 2002).

A. vinelandii sufre un proceso de enquistamiento que es caracterizado por la formación de varias capas de polisacárido alrededor de la célula, protegiéndola contra la desecación y el estrés mecánico. El alginato es esencial para el enquistamiento ya que es un componente básico de las dos capas (llamadas exina e intina) que cubren a los quistes maduros, de las cuales el 32 y 13 % de su peso seco es alginato (Page y Sadoff, 1975). Campos *et al.* (1996) y Mejía-Ruiz *et al.* (1997) demostraron que mutantes no productoras de alginato son incapaces de formar quistes maduros. Por otra parte, la acetilación que presenta el alginato cumple la función de incrementar las fuerzas de interacción al agua, aumentando de esta forma las posibilidades de sobrevivencia en condiciones desecantes en el quiste (Ertesvåg *et al.* 1996). Se ha propuesto que el alginato cumple una función estructural en los microquistes que forma *A. vinelandii*. Sin embargo, esto no explica la abundante producción de alginato extracelular durante el crecimiento vegetativo de la bacteria. Sutherland (1990) ha propuesto que el alginato no tiene una función única y como otros tantos exopolisacáridos, debe contribuir con una amplia gama de funciones que dependen del ambiente. Por otro lado, Kennedy y Toukdarian (1987) han aportado evidencias que sugieren que el alginato no sirve como un metabolito de reserva de energía para *A. vinelandii*. Se ha propuesto que el biopolímero funciona como una barrera protectora contra la toxicidad de metales pesados, como una barrera difusional de oxígeno y como un sistema de intercambio de iones, con alta selectividad por iones calcio, particularmente cuando el alginato está formando un gel (Ertesvåg *et al.* 1996; Clementi *et al.* 1999).

2.3 APLICACIONES DE LOS ALGINATOS

Los alginatos son utilizados comercialmente como agentes gelificantes, formadores de películas para protección de alimentos, estabilizantes y espesantes (Tinoco, 1993; Gacesa, 1998). La *tabla 2.1* resume las principales aplicaciones del alginato en diversas industrias.

Tabla 2.1. Propiedades funcionales y usos industriales de los alginatos (López-Munguía *et al.* 1993; Gacesa, 1998).

INDUSTRIA	USOS	PRODUCTOS
ALIMENTOS	Estabilizador de emulsiones Agente gelificante	Helados Gelatinas, rellenos para panificación, Cubierta de embutidos
	Espesante	Salsas y aderezos Productos enlatados Congelados y deshidratados
	Estabilizador de espuma	Cervezas y vinos
FARMACÉUTICA	Emulsificante y espesante Agente desintegrador Agente de suspensión	Jabones y lociones Tabletas Ungüentos, antiácidos y antibióticos
PAPEL	Agente de suspensión	Corte y dimensiones del papel
TEXTIL	Espesante y gelificante	Impresión de géneros
OTRAS	Agente gelificante	Explosivos Impresiones dentales Biocatalizadores

En medicina, los alginatos de alta calidad se usan para inmovilizar células β del páncreas en cápsulas de alginato, las cuales funcionan como un páncreas artificial en el tratamiento de la diabetes tipo I, (Sabra *et al.* 2001). Se han reportado también que los alginatos estimulan el sistema inmunológico a través de monocitos, ayudándoles a secretar citocinas, por ejemplo, para la expresión de interleucinas y factores α en necrosis tumorales (Otterlei *et al.* 1991).

La calidad del alginato está determinada principalmente por el PMP_M , el cual se define como el promedio del peso molecular de todos los alginatos producidos en un cultivo. En base a este parámetro se define el índice de polidispersión (IP), el cual muestra la dispersión de las familias de alginato producidas y equivale al cociente PMP_M /Mediana del peso molecular (Clementi *et al.* 1998).

En la actualidad, se producen entre 35,000 y 40,000 toneladas de alginato con fines comerciales (Boswell, 2002). La importancia de los alginatos radica en su capacidad para modificar las propiedades reológicas de los sistemas acuosos (Sutherland, 1990). El precio en el mercado del alginato oscila entre 5 y 20 dólares por kilogramo, para la mayoría de las aplicaciones. Sin embargo, alginatos de alta calidad y pureza, usados en la industria farmacéutica alcanzan precios de hasta 40,000 dólares por kilogramo (Boswell, 2002). Una alternativa para satisfacer estas necesidades, así como también para bajar su costo, la podemos encontrar en la producción de este biopolímero por fuente microbiana. En este campo pueden competir comercialmente los biopolímeros generados por *A. vinelandii* (Rehm y Valla, 1997; Pszczola, 1998).

2.4 GENERALIDADES DE *Azotobacter vinelandii*

Las bacterias del género *Azotobacter* son microorganismos mucoides naturales del suelo, Gram-negativos y aerobios estrictos, móviles a través de flagelos peritricos y son capaces de fijar nitrógeno. Los productos obtenidos a partir del crecimiento de *A. vinelandii* de importancia comercial son el alginato y el polihidroxibutirato (PHB), un polímero de reserva intracelular (Kennedy y Toukdarian, 1987).

2.4.1 Biosíntesis de alginato en *A. vinelandii*

Pindar y Bucke (1975) propusieron inicialmente la ruta biosintética de alginato en *A. vinelandii*. Reportaron la presencia de algunas enzimas que previamente habían sido caracterizadas en la síntesis de alginato en algas. Los pasos de biosíntesis de la producción de alginato en *A. vinelandii* son muy similares (Lynn y Sokatch, 1984; Lloret *et al.* 1996).

Como se presenta en la **figura 2.3**, la sacarosa es transportada al interior de la célula. Una vez en el citoplasma, una invertasa la hidroliza liberando glucosa y fructosa. Luego de formarse las 2 hexosas-6-fosfato correspondientes tiene lugar la formación de manosa-1-fosfato por la acción de la enzima fosfomanosa isomerasa. La manosa-1-fosfato es esterificada con GTP por acción de la enzima GDP manosa pirofosforilasa, para obtener GDP-manosa. Por la acción de la GDP-manosa deshidrogenasa se obtiene GDP-ácido manurónico, que es el monómero precursor del ácido polimanurónico, obtenido por la acción del complejo enzimático “polimerasa” (Pindar y Bucke 1975; Espín 2002). Hasta la producción del GDP-ácido manurónico, el proceso sucede en el citoplasma de *A. vinelandii*. La polimerización del alginato se lleva a cabo en la membrana citoplasmática de la célula.

2.5 FACTORES QUE INFLUYEN EN LA BIOSÍNTESIS DEL ALGINATO PRODUCIDO POR *A. vinelandii* EN CULTIVOS EN LOTE

Se han realizado estudios a fin de investigar el efecto de muchos de los factores que afectan la biosíntesis del alginato (nutrimentos, fuente de carbono, temperatura, pH y TOD, entre otros). El efecto de cada uno de estos factores ha sido cuantificado en términos cinéticos, tales como

velocidades de crecimiento, producción de alginato, consumo de fuente de carbono, rendimientos y productividades (Jarman *et al.* 1978; Horan *et al.* 1981, 1983; Chen *et al.* 1985; Brivonese y Sutherland 1989; Clementi *et al.* 1995; Peña *et al.* 1997; Parente *et al.* 1998; Peña 1998; Clementi *et al.* 1999; Trujillo 1999; Peña *et al.* 2000; Trujillo-Roldán *et al.* 2001; Seáñez *et al.* 2001).

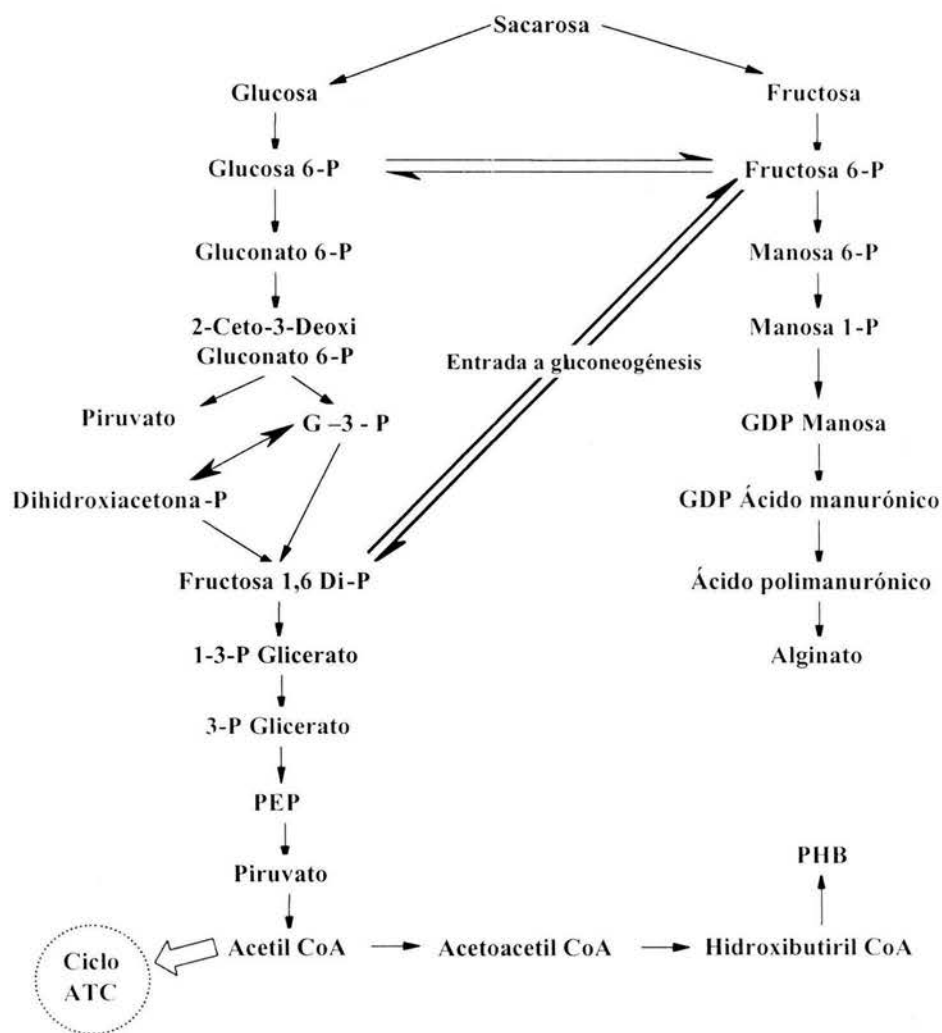


Figura 2.3. Ruta de biosíntesis de alginato en *A. vinelandii* (Sabra *et al.* 1999).

Horan *et al.* (1981) reportaron mayores productividades de alginato a bajas concentraciones de fosfatos, demostrando este efecto usando varias fuentes de carbono. El efecto de la temperatura en la síntesis de alginato por *A. vinelandii* también ha sido estudiado, reportándose un valor óptimo de temperatura entre 30 y 35°C (Chen *et al.* 1985; Clementi *et al.* 1995). Cantidades iniciales de fuente de carbono >20 g/L no incrementan las velocidades específicas de crecimiento y en algunos casos se han reportado inhibiciones del crecimiento (Brivonese y Sutherland, 1989). La tensión de oxígeno disuelto (TOD) juega un papel de suma importancia en la producción de alginato. A bajos niveles de oxígeno disuelto (~1 %) el microorganismo sintetiza grandes cantidades de PHB, mientras que a altos niveles de oxígeno disuelto (> 5%), *A. vinelandii* usa la fuente de carbono predominantemente en la producción de biomasa (Horan *et al.* 1981). Horan *et al.* (1983), en experimentos bajo tensiones de oxígeno disuelto controladas (1.0 % a 10.0 %), encontraron que la productividad máxima en términos de alginato está entre 2 y 5 % de TOD. Peña (1998) demostró que en cultivos controlados al 3 % de TOD se obtiene la máxima cantidad de alginato. Jarman *et al.* (1978) reportaron que hay una mayor producción de alginato a una alta velocidad de agitación (700 rpm) utilizando un biorreactor (1 L) de dimensiones estándares, equipado con 4 deflectores.

En nuestro grupo de investigación se ha generado información sobre el efecto de la aireación y de la TOD en los cultivos de *A. vinelandii*, sobre la producción y peso molecular de los alginatos. Peña *et al.* (1997) llevaron a cabo cultivos de *A. vinelandii* en matraces con deflectores, donde las bacterias crecieron casi al doble y produjeron tres veces menos alginato que aquellos cultivos llevados a cabo en matraces convencionales. Las viscosidades más altas fueron aquellas de los cultivos en matraces convencionales (520 cps) con respecto a los matraces con deflectores (30 cps). Este último fenómeno fue relacionado con un cambio en las características moleculares del

polímero (Peña *et al.* 1997). El peso molecular del alginato aumentó con respecto al tiempo de cultivo y posteriormente fue depolimerizado. Al final de los cultivos, el PMP_M del alginato obtenido en los matraces convencionales fue cinco veces mayor que el PMP_M del alginato de los matraces con deflectores.

Posteriormente, en cultivos en fermentador, Peña *et al.* (2000) reportaron como la TOD (en el intervalo de 0.5 a 5 %) y la hidrodinámica (velocidades de agitación en el intervalo de 300 a 700 rpm) afectaban la producción de alginato así como el peso molecular del polímero. En condiciones de baja velocidad de agitación (300 rpm) y una alta TOD (5 %), el cultivo produjo más alginato (4.5 g/L) que lo obtenido a la misma agitación pero a una TOD de 0.5 % (1.0 g/L). Por otra parte, los valores más altos de PMP_M del alginato se obtuvieron a bajas velocidades de agitación.

Anterior al trabajo de Peña *et al.* (2000) se reportaron otros trabajos que demostraron el efecto de la TOD sobre la producción de alginatos por *A. vinelandii*. Por ejemplo, en cultivos con y sin control de TOD, Parente *et al.* (1998) observaron que la mayor concentración final de alginato (3.8 g/L) es obtenida en los cultivos llevados a cabo sin control de TOD. Sin embargo, este cultivo sin control osciló entre 2 y 4 % de TOD. El control de la TOD reportado por Parente *et al.* (1998) fue realizado mediante la manipulación de la velocidad de agitación, lo que no permitió separar los efectos causados por cambios hidrodinámicos, de aquellos debidos exclusivamente a la TOD. En un trabajo posterior de nuestro grupo, Trujillo-Roldán *et al.* (2001) reportaron el efecto de oscilaciones de TOD sobre el metabolismo de *A. vinelandii* y el alginato producido. Las oscilaciones sinusoidales de la TOD se llevaron a cabo con la manipulación de las presiones parciales del oxígeno y del nitrógeno en la entrada de un biorreactor de 1.0 L. Se evaluaron los

efectos del período de oscilación (tiempo en que dura una oscilación) y de la amplitud de la onda (valor sobre el que oscila la TOD), con un eje de la oscilación fijo en 3 % de TOD. Se pudo observar que la amplitud de la oscilación tenía un efecto importante en el PMP_M del alginato. Sin embargo, nunca se obtuvieron alginatos de mayor PMP_M que el obtenido bajo una TOD constante de 3 % (350 KDa). Los resultados de este estudio hicieron evidente la compleja regulación que tiene *A. vinelandii* sobre cambios muy pequeños en la TOD, principalmente en las características moleculares del alginato.

Trujillo-Roldán *et al.* (2001) reportaron que la depolimerización del alginato es evidente hacia el final del cultivo y, a su vez, la magnitud de la caída en el PMP_M parecía ser función de la TOD. Otro de los gases que ha sido estudiado en nuestro grupo ha sido el bióxido de carbono en la corriente de entrada de los gases (0 – 25 % v/v) y su efecto sobre la producción y el PMP_M del alginato producido por *A. vinelandii* (Seáñez *et al.* 2001). El crecimiento de la biomasa y la producción del alginato fueron inhibidos a niveles bajos de CO_2 (4 – 8 %), pero estimulados a niveles altos (13 %). Trujillo-Roldán *et al.* (2004) han demostrado que el PMP_M y el IP en fermentaciones de *A. vinelandii* son funciones de la tensión de oxígeno disuelto (TOD) en el medio de cultivo. Pequeñas variaciones o malos controles de la TOD afectan sustancialmente el IP y el PMP_M del alginato producido.

En resumen, sobre la producción de alginato, nuestro grupo ha estudiado la influencia de diversos parámetros de cultivo, tales como la concentración de oxígeno disuelto (constante y oscilante), la concentración de CO_2 y la velocidad de agitación. Tales estudios se han realizado en cultivos en matraces y en biorreactor. Los mejores resultados en cuanto a las funciones objetivo del cultivo de *A. vinelandii* ($Y_{P/X}$, PMP_M y la concentración de alginato) se han obtenido en matraces. El

parámetro fisiológico relevante que diferencia a estos procesos es la μ . En matraces se obtiene una μ inferior a 0.1 h^{-1} , mientras que en biorreactor es generalmente superior a 0.15 h^{-1} .

2.6 CULTIVOS CONTINUOS DE *A. vinelandii* Y OTROS MICROORGANISMOS

Los cultivos continuos se caracterizan porque es posible establecer la μ del microorganismo entre valores muy cercanos a cero y valores máximos, simplemente fijando la tasa de dilución (D) al valor deseado. Para mantener la tasa de dilución constante, una solución estéril de nutrientes es continuamente alimentada al cultivo y simultáneamente, el medio de cultivo agotado es continuamente removido del biorreactor. Es decir, se mantiene un flujo de entrada y uno de salida constante e iguales, por lo que el volumen del biorreactor se mantiene constante (Doran, 1995).

Los estudios pioneros de la producción de alginato por *A. vinelandii* fueron realizados por Deavin *et al.* (1977), quienes, en cultivo continuo y bajo condiciones de limitación de fosfatos, observaron que la velocidad de síntesis de alginato fue independiente de la velocidad específica de crecimiento (μ). En este caso, se observó que la concentración de biomasa se incrementó a bajas tasas de dilución ($D = 0.1 - 0.05 \text{ h}^{-1}$), al igual que la concentración total de alginato, comparados con cultivos continuos realizados a tasas de dilución altas ($> 0.15 \text{ h}^{-1}$). Jarman *et al.* (1978) y Jarman (1979) reportaron un estudio en cultivo continuo de *A. vinelandii* variando la velocidad específica de crecimiento (μ) y la concentración de los diversos nutrientes. Obtuvieron altas velocidades de síntesis de exopolisacárido cuando existía limitación de nitrógeno en el medio de cultivo. La biomasa fue constante en tasas de dilución de $0.15-0.25 \text{ h}^{-1}$, pero incrementó la acumulación intracelular de PHB. En ese trabajo también se observó que la concentración de

alginate se incrementó conforme disminuyó la velocidad específica de crecimiento ($< 0.1 \text{ h}^{-1}$). Annison y Couperwhite (1986) evaluaron el efecto de μ sobre la composición y producción de alginate sintetizado en cultivos continuos por *A. vinelandii* a diferentes concentraciones de fosfatos. En todas las condiciones, se observó que la producción de alginate disminuía conforme se incrementaba la velocidad específica de crecimiento. La discusión de sus resultados se limitó al análisis del efecto de tasas de dilución altas ($> 0.15 \text{ h}^{-1}$).

En la *figura 2.4* se ilustran los resultados obtenidos por Annison y Couperwhite, donde se observa que a velocidades específicas de crecimiento bajas ($D < 0.10 \text{ h}^{-1}$) se registran las mayores concentraciones de alginate producido; sin embargo, hay una clara disminución de la concentración de alginate cuando *A. vinelandii* fue crecido a tasas de dilución superiores a 0.15 h^{-1} .

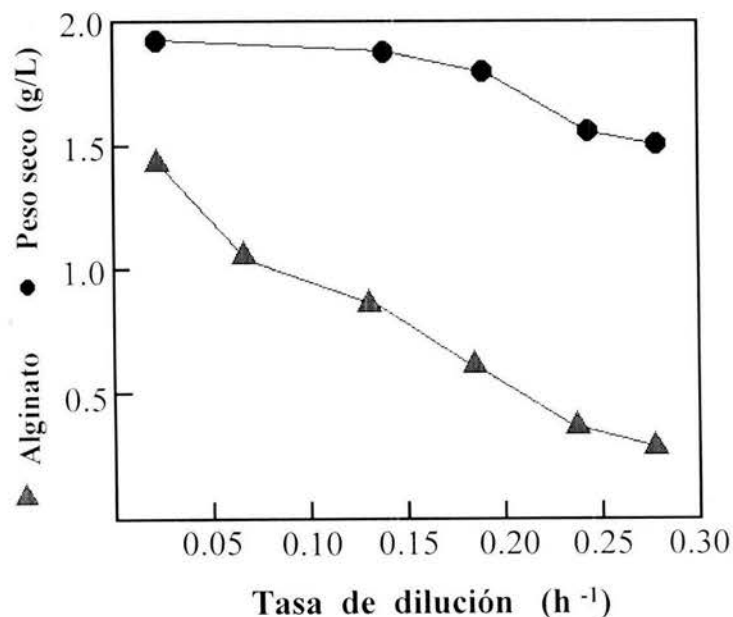


Figura 2.4. Efecto de la tasa de dilución en la producción de biomasa y alginate producido por *A. vinelandii* en cultivos continuos (reproducido de Annison y Couperwhite, 1986).

Resultados similares han sido reportados en la literatura para otros sistemas. Tal es el caso de la producción de alginato por *Pseudomonas mendocina* (Sengha *et al.* 1989) en cultivo continuo. En la *figura 2.5* se observa que, conforme disminuye la tasa de dilución, la producción del exopolisacárido aumenta considerablemente. A tasas de dilución bajas ($< 0.1 \text{ h}^{-1}$), el porcentaje de conversión de la fuente de carbono en producto es alta (60 %) comparado con los porcentajes de conversión en cultivos continuos desarrollados a tasas de dilución superiores a 0.2 h^{-1} .

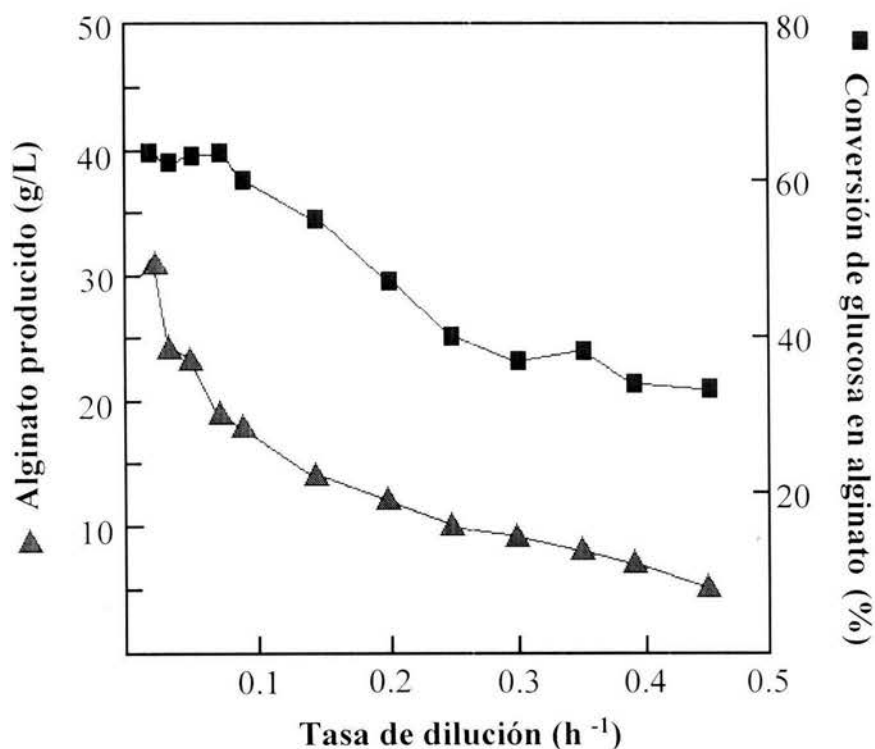


Figura 2.5. Efecto de la tasa de dilución en la producción de alginato producido por *P. mendocina* y conversión de glucosa a producto en cultivos continuos (reproducido de Sengha *et al.* 1989).

2.7 CULTIVOS EXPONENCIALMENTE ALIMENTADOS

Tomando en cuenta las evidencias experimentales presentadas en este capítulo, las cuales sugieren que parámetros cinéticos como la μ podrían estar impactando fuertemente la producción y calidad del alginato sintetizado por *A. vinelandii*, y que en ninguno de los trabajos previos se ha propuesto la existencia de este posible efecto, se desarrolló el siguiente proyecto, en el cual se implementó un proceso de cultivo exponencialmente alimentado, como estrategia para determinar el efecto de μ sobre las funciones objetivo ($Y_{P/X}$, PMP_M y concentración de alginato) en los cultivos de *A. vinelandii*.

Un cultivo alimentado (*fed-batch*) es definido como un sistema donde uno o más nutrientes son suministrados al biorreactor durante el tiempo de fermentación y los productos y demás componentes se mantienen dentro del sistema, hasta el final de la corrida (Yamane y Shimizu, 1984). Es decir, existe un flujo de entrada pero no un flujo de salida y el volumen cambia con respecto al tiempo. Se puede decir que las fermentaciones alimentadas representan una operación intermedia en cuanto a complejidad entre un proceso en lote y uno continuo. Existen muchas modalidades de fermentaciones alimentadas (Yamane y Shimizu, 1984). Además, es posible alimentar uno o varios componentes del medio de cultivo. La alimentación en forma exponencial tiene un gran atractivo ya que el proceso se aproxima al comportamiento de un sistema en continuo (quimiostato). Una característica de esta estrategia es que el producto de interés no es removido del sistema, como en el cultivo continuo, sino que se acumula en el reactor hasta el final del cultivo. Las fermentaciones exponencialmente alimentadas, al igual que en cultivo continuo, pueden ser usadas para determinar la relación entre la velocidad específica de crecimiento y funciones objetivo del proceso, tales como rendimientos, producción final del

metabolito de interés y consumo de substratos (Pirt, 1974). Usando cultivos alimentados se han obtenido resultados interesantes en otros sistemas, como por ejemplo, para la producción de pululanos, polisacárido extracelular sintetizado por *A. pullulans* (Youssef *et al.* 1999) y Vandeska *et al.* (1996) reportaron la producción de xilitol, sacárido extracelular sintetizado por *Candida boidinii*. La concentración de pululanos y de xilitol aumentó en procesos *fed-batch* cuando la velocidad específica de crecimiento fue menor a 0.02 h^{-1} . Otro ejemplo similar es el reportado para la producción de penicilina acilasa por *E. coli* (Ramírez *et al.* 1994). En general, en todos ellos se ha observado una mayor producción del metabolito de interés a bajas velocidades específicas de crecimiento. En *A. vinelandii* no existe ningún reporte en donde se haya ensayado esta técnica.

CAPÍTULO III

3.1 HIPÓTESIS

Un sistema de cultivo que permita manejar bajas velocidades específicas de crecimiento, maximizará las funciones objetivo de fermentaciones de *Azotobacter vinelandii*, tales como el rendimiento ($Y_{p/x}$) y el peso molecular del alginato sintetizado.

OBJETIVOS

3.2 GENERAL

Establecer y evaluar un proceso de fermentación que permita, mediante la manipulación de la velocidad específica de crecimiento, incrementar el rendimiento ($Y_{p/x}$) y el peso molecular del alginato producido por *Azotobacter vinelandii*.

3.3 ESPECÍFICO

Determinar el efecto de bajas velocidades específicas de crecimiento ($\mu < 0.1 \text{ h}^{-1}$), establecidas mediante el uso de cultivos exponencialmente alimentados, sobre el rendimiento ($Y_{p/x}$) y el peso molecular promedio máximo (PMP_M) del alginato producido por *A. vinelandii*.

CAPÍTULO IV

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 CEPA, MEDIO DE CULTIVO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO

El microorganismo utilizado fue *Azotobacter vinelandii* SML2, derivado de la cepa de colección ATCC 4096. La cepa SML2 posee una mutación en el gen *alg L* por inserción de un cassette de resistencia a gentamicina por lo que esta mutante es incapaz de producir alginasas. Una completa descripción de la construcción de esta cepa ha sido previamente publicada (Trujillo-Roldán *et al.* 2003b).

A. vinelandii SML2 fue crecida en medio Burk modificado (Peña *et al.* 1997). El medio de cultivo contiene: 20 g L⁻¹ de sacarosa, 3 g L⁻¹ extracto de levadura, 660 mg L⁻¹ de K₂PO₄, 160 mg L⁻¹ de KH₂PO₄, 1.42 g L⁻¹ de MOPS, 50 mg L⁻¹ de CaSO₄·2H₂O, 200 mg L⁻¹ de NaCl, 200 mg L⁻¹ de MgSO₄·7H₂O, 27 mg L⁻¹ de FeSO₄·7H₂O, 2.9 mg L⁻¹ de NaMoO₄·2H₂O. El pH del medio de cultivo se ajustó a 7.2 con NaOH 2 N y se esterilizó durante 20 min a 120 °C.

Los experimentos presentados en este trabajo se realizaron por duplicado. En los gráficos de resultados se presentan barras de desviación que indican los valores máximos y mínimos obtenidos entre réplicas. En algunos casos, las desviaciones son de la misma magnitud del símbolo empleado.

4.2 CULTIVOS EN LOTE

La cepa *SML2* se preservó a 4°C en tubos inclinados (*slants*) con medio Burk solidificado con agar (18 g L⁻¹), sin extracto de levadura. El mantenimiento se realizó con resiembras mensuales como ha sido descrito previamente por Peña *et al.* (1997).

Para la obtención de inóculos, se resembró, de los *slants* a medio sólido (cajas Petri) y se incubó (por triplicado) a 29°C durante 72 h. Tres asadas de las células de la placa fueron usadas para inocular los matraces (por triplicado), los cuales se incubaron durante 24 h a 29 °C, a una velocidad de agitación de 200 rpm. Se seleccionaron 2 matraces (cuya absorbancia fue cercana a 0.1 en diluciones 1:50 y que representó valores ~ 0.3 g/L de biomasa en el fermentador al comienzo del cultivo) los cuales fueron usados como inóculo para los cultivos en un fermentador. Trujillo-Roldán *et al.* (2003a) demostraron que los componentes del medio de cultivo agotado pertenecientes al inóculo tiene un importante papel regulador en la biosíntesis de alginato. Ellos compararon cinéticas de cultivos de *A. vinelandii* que se diferenciaron por la forma de inocular las fermentaciones. Inocularon cultivos de forma convencional (incluye las células de *A. vinelandii* y el caldo de cultivo agotado) e inocularon fermentaciones con células lavadas (incluye las células de *A. vinelandii* sin el medio agotado). En cultivos inoculados con células lavadas se obtuvieron mayores concentraciones de alginato con PMP_M más altos, comparados con los valores obtenidos en cultivos convencionalmente inoculados. Trujillo-Roldán *et al.* (2003a) sugieren que esta nueva forma de inocular los cultivos de *A. vinelandii* permite que los estudios sean conducidos de una forma más controlada y que los datos obtenidos puedan ser mejor interpretados con respecto a la biosíntesis del alginato. Es por ello que en este trabajo se decidió inocular las fermentaciones con células lavadas.

Los cultivos en lote y alimentados fueron realizados en un fermentador Applikon (Holland) de 2.5 L, con un volumen de trabajo de 1.8 L, equipado con dos turbinas Rushton (diámetro impulsor/diámetro tanque = 0.35), de 6 paletas planas y un difusor de 7 orificios para efectuar la aireación por burbujeo. El pH fue controlado a 7.2 de forma *on-off*, adicionando automáticamente NaOH 2 N, usando un amplificador-controlador de pH (Ingold 2300, Columbus OH) ayudado de una bomba peristáltica. La tensión de oxígeno disuelto (TOD) fue determinada mediante un electrodo polarográfico de oxígeno (Metter-Toledo, Columbus OH). La señal fue transmitida a un amplificador de oxígeno (Ingold, Columbus OH) y adquirida por una PC Compaq Deskpro. La TOD fue controlada en línea usando un programa escrito en *LabView*. La TOD fue mantenida al 3 % mediante la manipulación de la presión parcial de nitrógeno y oxígeno en la alimentación, a través de controladores de flujo másico (Brooks Instruments 0154E) y usando un algoritmo de control proporcional-integral-derivativo (PID) (Peña *et al.* 2000; Trujillo-Roldán, 2001). Los cultivos fueron crecidos a 29°C usando un velocidad de agitación de 700 rpm y una velocidad de aireación de 0.6 vvm. Con el sistema descrito se pudo controlar satisfactoriamente la TOD en valores cercanos al *set point*.

4.3 CULTIVOS EXPONENCIALMENTE ALIMENTADOS (CEA)

Un total de 3 CEA fueron realizados por duplicado. Cada uno se mantuvo a una tasa de dilución constante, variando la tasa de alimentación de acuerdo al perfil descrito en la ecuación (2) (ver adelante). El rango de velocidades de dilución evaluadas fue entre 0.03 a 0.09 h⁻¹ para los diferentes experimentos. Los CEA fueron realizados en el mismo sistema previamente descrito, con la incorporación de un compartimiento en donde se almacenó el sustrato limitante a una

concentración de 120 g L^{-1} (sacarosa). (**figura 4.1**). Los cultivos se realizaron en un biorreactor de 2.5 L a 3 % de TOD constante, 700 rpm y 29°C , utilizando la cepa de *A. vinelandii* SML2 (Trujillo-Roldán *et al.* 2003b). Los CEA se iniciaron con una etapa en lote, prosiguiendo con la etapa de alimentación. Para la adición de la sacarosa se utilizó una bomba peristáltica de precisión (BioChemTechnology, Malvern, PA), se incrementó el flujo de la bomba cada 15 minutos de forma manual, un ejemplo del cálculo para el perfil exponencial de alimentación se muestra en anexo 1. El biorreactor fue operado con un volumen de trabajo de 1.8 L.

4.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.4.1 Determinación de biomasa por gravimetría

La determinación de biomasa se llevó a cabo por un método gravimétrico de peso seco previamente descrito (Peña *et al.* 1997; Peña, 1998; Trujillo-Roldán *et al.* 2001). Se mezclaron 10 mL de caldo de cultivo con 1.0 mL de Na_2EDTA (0.1 M) y 1.0 mL de NaCl (1.0 M). Se centrifugó a 15,500 g durante 20 minutos (centrífuga Eppendorf 5804). Se separó el sobrenadante y posteriormente el centrifugado (paquete celular), se lavó con una mezcla de 0.1 M EDTA : 1 M NaCl (1:1 v/v). El paquete celular fue filtrado al vacío a través de membranas *Nucleopore* de $0.45 \mu\text{m}$ de tamaño de poro, previamente taradas. La membrana se secó por 24 h a 70°C en estufa (Felisa), para finalmente pesarse y obtener (por diferencia de peso) la cantidad de biomasa (g/L).

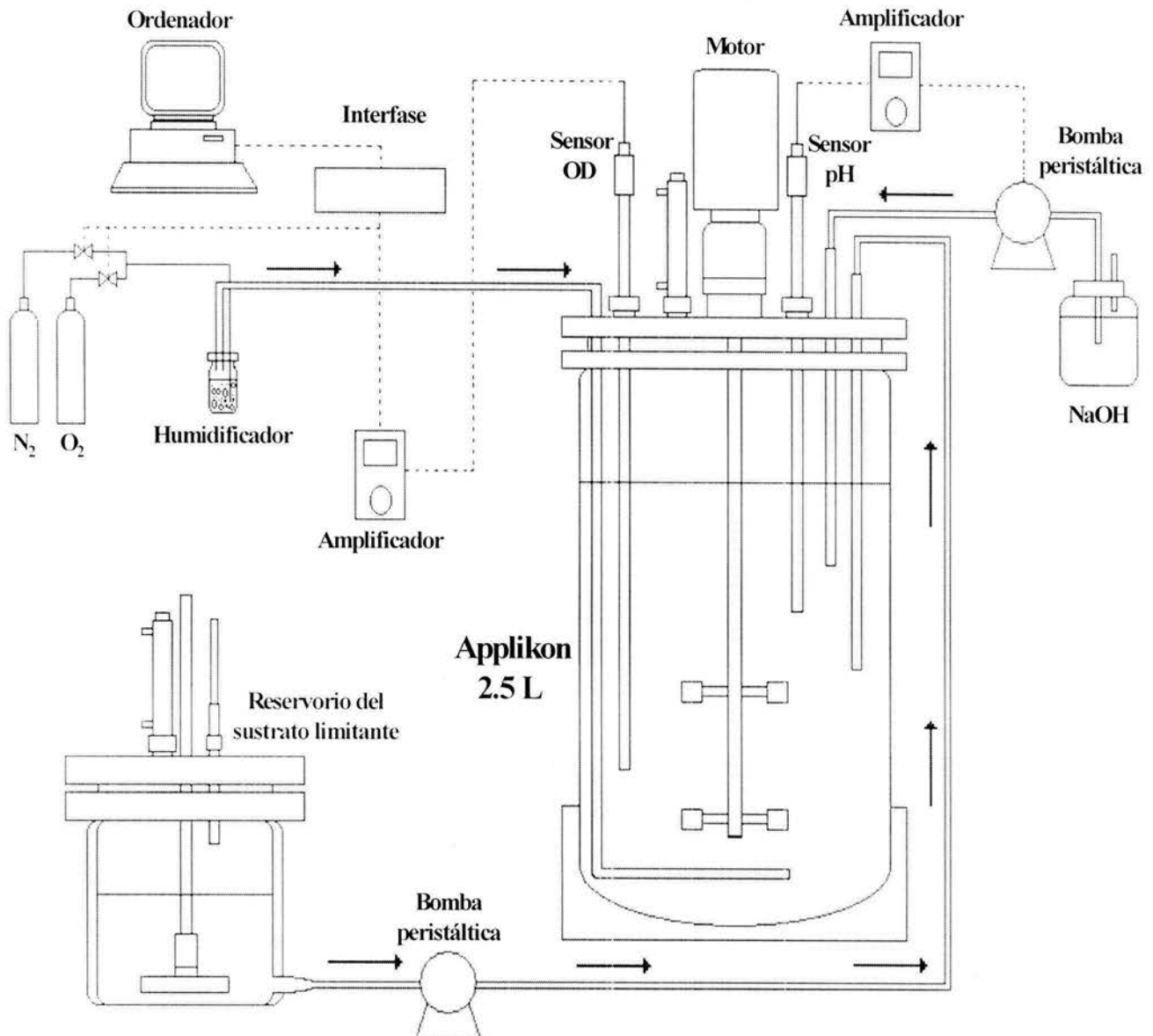


Figura 4.1. Sistema de fermentación, control y adquisición de datos para cultivos exponencialmente alimentados.

4.4.2 Determinación de biomasa por turbidimetría

Se tomó una alícuota de 1.0 mL del caldo de fermentación y se diluyó 1/50 con agua destilada. Posteriormente, se leyó la absorbancia de la muestra a 540 nm en un espectrofotómetro Beckman modelo DU 650. Los valores se usaron como una forma rápida de determinar el crecimiento bacteriano en el medio de cultivo extrapolándolos en la curva patrón (*figura 4.2*), la cual se elaboró utilizando soluciones de biomasa a diferentes concentraciones (Miranda, 1998; Peña, 1998; Trujillo, 1999).

4.4.3 Determinación de sacarosa por el método cromatográfico

La concentración de sacarosa se determinó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Se utilizó una columna para análisis de carbohidratos (WAT084038 Waters) de 3.9 x 300 mm, acoplada a un equipo de HPLC (Waters, 625) con un detector de índice de refracción (Waters, 410). Como fase móvil se utilizó acetonitrilo/agua (95% v/v) a un flujo de 1.0 mL/minuto, isocrático y a una temperatura de 35 °C. La calibración de la columna se llevó a cabo con un método estándar de calibración utilizando sacarosa grado analítico (J. T. Baker) como estándar. Se obtuvieron dos curvas patrón de sacarosa (*figura 4.3*), la primera para un rango de concentraciones bajas (0.05-4.0 g L⁻¹). Ésta curva fue utilizada para determinar la concentración de sacarosa en los cultivos exponencialmente alimentados, ya que en estas fermentaciones la concentración inicial de sacarosa fue de 2 g L⁻¹. Dicha concentración fue disminuyendo hasta llegar valores limitantes del crecimiento y fue mantenida a estos niveles para manipular la μ . La segunda curva patrón abarca un rango más amplio de concentraciones (4.0-20 g L⁻¹), la cual fue

utilizada para determinar la concentración de sacarosa durante los cultivos en lote porque la concentración inicial de este sustrato en estas fermentaciones fue de 20 g L^{-1} . Para el análisis se inyectaron $50 \mu\text{L}$ del caldo de cultivo previamente centrifugados a $15,500 \text{ g}$ (centrífuga Eppendorf 5804) durante 20 minutos y filtrados en membrana *Nucleopore* de $0.22 \mu\text{m}$. El método resultó sencillo y con un tiempo de ejecución de 15 minutos por muestra.

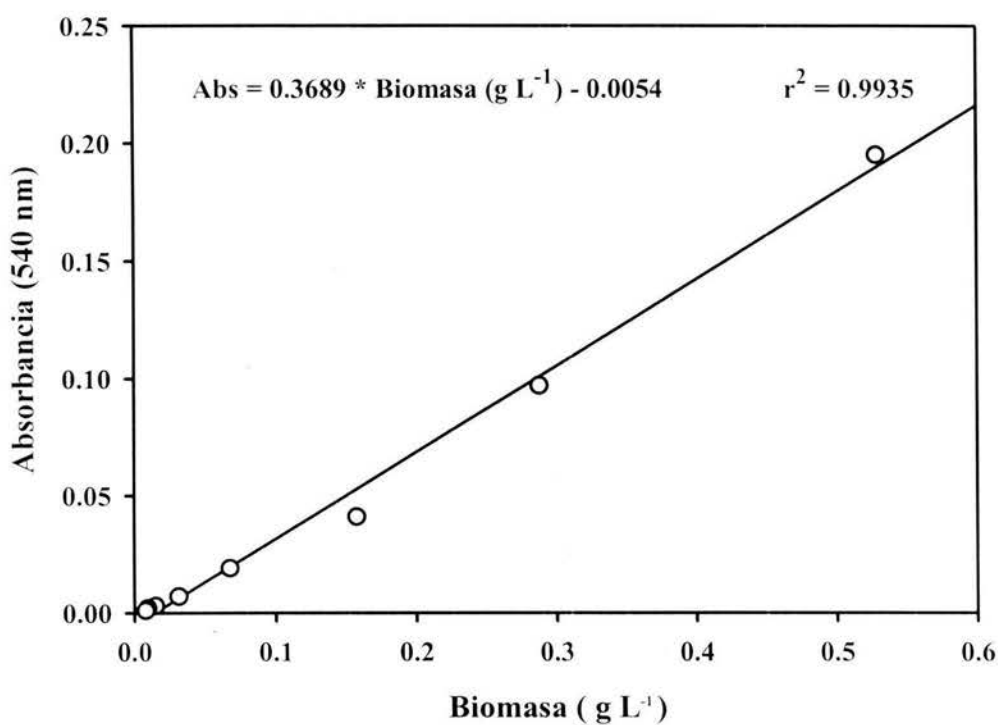


Figura 4.2. Curva patrón para la determinación de biomasa por turbidimetría.

4.4.4 Extracción y cuantificación del alginato

La técnica se basa en la precipitación del alginato con isopropanol y cuantificación gravimétrica del mismo (Jarman *et al*, 1978; Peña *et al*, 1997). El procedimiento es como sigue: se mezclaron 10 mL de caldo de cultivo con 1 mL de Na₂EDTA (0.1 M) y 1 mL de NaCl (1.0 M) y posteriormente se centrifugó a 15,500 g (centrífuga Eppendorf 5804) por 20 minutos. Se separó el sobrenadante y se mezcló con 30 mL de isopropanol, dejando reposar 10 minutos, para la precipitación del producto, centrifugándose nuevamente a 15,500 g durante 20 minutos. El producto se filtró en membranas *Nucleopore* de 0.22 µm, los cuales se secaron a 70°C por 24 h (hasta peso constante). Finalmente, se pesó el filtro y se calculó (por diferencia de peso) la concentración del polisacárido en el medio.

4.4.5 Distribución de pesos moleculares

La distribución de pesos moleculares se determinó por cromatografía de filtración en gel (CFG) usando un par de columnas de *Ultrahidrogel* (UG 500 Waters y lineal Waters) de 7.8 mm (diámetro interno) por 300 mm, acopladas en serie a un equipo de HPLC (Waters, 625) con un detector de índice de refracción (Waters, 410). Como fase móvil se utilizó NaNO₃ 0.1 M a 35 °C a un flujo de 0.9 mL/minuto. La señal del detector fue procesada con un programa para PC compatible (Maxima GPC, Waters, Mildford MA, USA). La calibración de las columnas se llevó a cabo con un método estándar de calibración utilizando pululanos de *Aureobasidium pullulans* como estándares de peso molecular con un intervalo de 5,800 a 1,600,000 daltones (Peña *et al*. 1997). Para el análisis se inyectaron 50 µL de muestra (0.01 g de alginato disuelto en 10 mL de solución de NaNO₃ 0.1 M y filtrada en membrana *Nucleopore* de 0.22 µm).

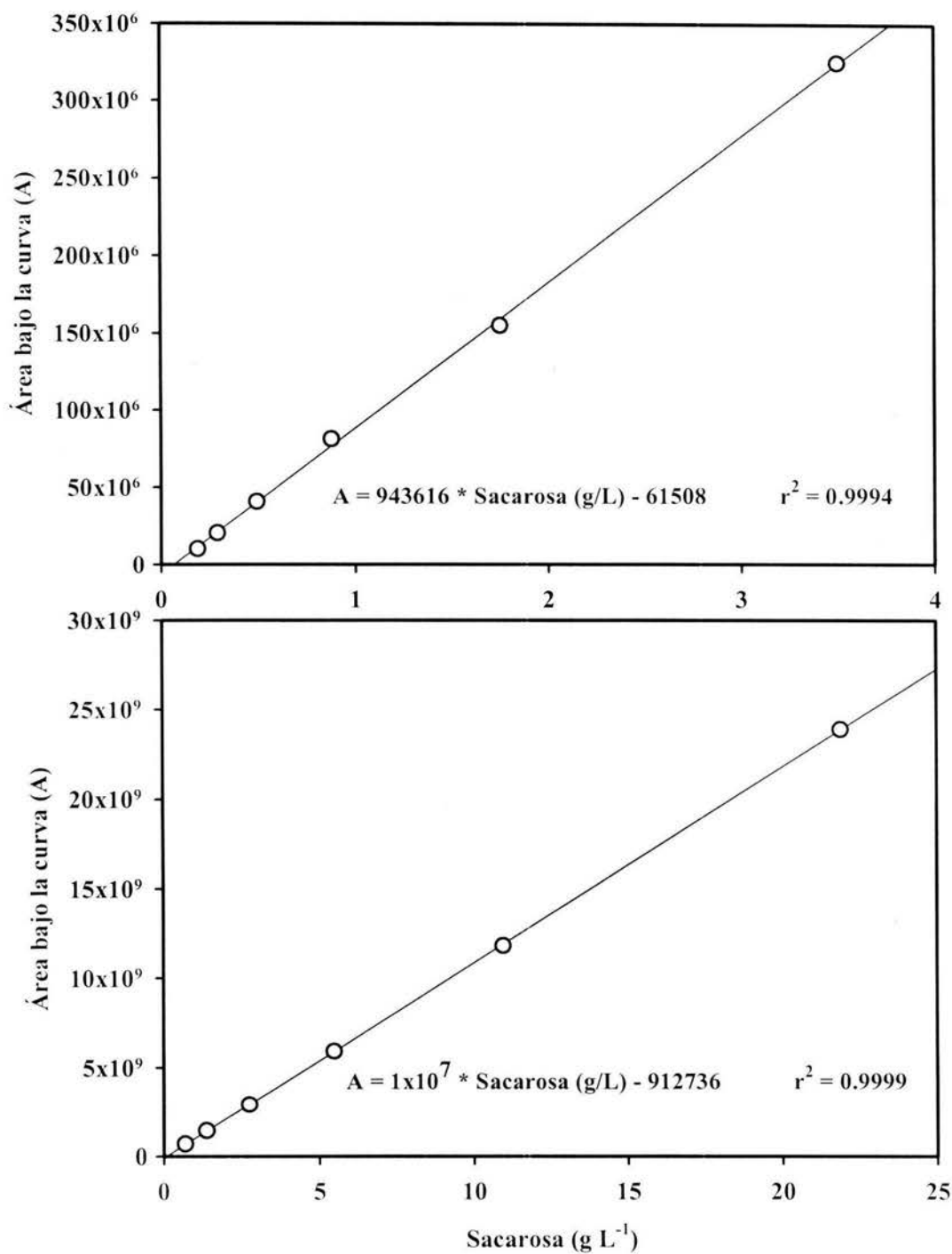


Figura 4.3. Curvas patrón para la determinación de sacarosa por HPLC.

4.5 CÁLCULO DE PARÁMETROS CINÉTICOS Y ESTEQUIOMÉTRICOS

La velocidad específica de crecimiento (μ) para los cultivos en lote fue calculada mediante la siguiente expresión:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (1)$$

Donde:

$$\frac{dX}{dt} = \text{Velocidad de crecimiento}$$

$\mu = \text{Velocidad específica de crecimiento en la fase exponencial}$

De la integral de la ecuación (1) se obtiene:

$$X = X_0 e^{\mu t}$$

Simplificando:

$$\ln X = \ln X_0 + \mu t$$

Posteriormente se graficó $\ln X$ contra el tiempo, y la pendiente obtenida representa la velocidad específica de crecimiento. La relación de alginato producido por unidad celular ($Y_{P/X}$) fue calculada en la etapa alimentada de todos los CEA's la cual se ha denominado $Y_{P/X}'$. Se realizó una corrección por el efecto de dilución en cada uno de los datos experimentales utilizados para el cálculo de éste parámetro.

4.6 ANÁLISIS MATEMÁTICO PARA CULTIVOS EXPONENCIALMENTE ALIMENTADOS

Se mantuvo una tasa de dilución constante predeterminada en un cultivo alimentado a un volumen, V . Este se incrementó exponencialmente con respecto al tiempo, tal como lo indica la siguiente ecuación:

$$V = V_0 \exp(At) \quad (2)$$

En donde V_0 es el volumen del cultivo antes de iniciar la alimentación, t es el tiempo y A es una constante fijada arbitrariamente. La tasa de alimentación, F , se obtiene diferenciando la ecuación (2) con respecto al tiempo:

$$\frac{dV}{dt} = F(t) = V_0 A \exp(At) \quad (3)$$

Ya que la tasa de dilución D es igual a flujo entre volumen, entonces:

$$\frac{F}{V} = D = A \quad (4)$$

El balance de células en el biorreactor está dado por:

$$\mu VX = \frac{d(VX)}{dt} \quad (5)$$

Rearreglando la ecuación (5) se obtiene:

$$\mu = \frac{d(\ln V)}{dt} + \frac{d(\ln X)}{dt} \quad (6)$$

En donde μ y X son la velocidad específica de crecimiento y la concentración celular, respectivamente. Combinando las ecuaciones (2), (4) y (6) se obtiene:

$$\mu = D + \frac{d(\ln X)}{dt} \quad (7)$$

El balance para el sustrato en un cultivo exponencialmente alimentado se obtiene por:

$$\frac{dS}{dt} = D(S_e - S) - \frac{\mu X}{Y_{X/S}} \quad (8)$$

En donde S y S_e son las concentraciones de sustrato en el biorreactor y en la alimentación, respectivamente. $Y_{X/S}$ es el rendimiento de biomasa con respecto al sustrato.

CAPÍTULO V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. CULTIVO EN LOTE

Los resultados del cultivo en lote se presentan en la *figura 5.1*. El experimento se realizó por duplicado y se graficaron las dos réplicas para mostrar la reproducibilidad de los datos. La concentración más alta de biomasa fue de $2.44 \pm 0.15 \text{ g L}^{-1}$, alcanzada después de las 15 h de cultivo (*figura 5.1a*), correspondiente al tiempo del agotamiento de la sacarosa y a la disminución de la concentración de oxígeno en la fase gaseosa necesaria para mantener la TOD constante (3 %) (*figura 5.1c*). A partir de este momento (~ 15 h), el pH se incrementó (monotónicamente) a valores por arriba de 8.0 unidades (*figura 5.1b*), que coincide con el agotamiento de la fuente de carbono. El alginato generado a las 27 h de cultivo fue de $3.18 \pm 0.2 \text{ g L}^{-1}$ (*figura 5.1b*). El $Y_{p/X}$ fue de $1.3 \pm 0.2 \text{ g alg/g biomasa}$ y la μ obtenida fue de $0.21 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$. Estos valores cinéticos son relativamente cercanos a los obtenidos por Trujillo-Roldán *et al.* (2003b), quienes realizaron fermentaciones con la misma cepa, bajo condiciones de cultivo similares a las reportadas en este trabajo, exceptuando el volumen de trabajo y la geometría del reactor. La TOD fue relativamente cercana al *set point* (3.0 %). El PMP_M del alginato producido bajo estas condiciones de cultivo fue de $95 \pm 8 \text{ KDa}$.

El porcentaje de conversión de sacarosa en alginato fue calculado a partir de la relación estequiométrica obtenida por Beale y Foster (1996). Ellos realizaron estudios de resonancia magnética nuclear para demostrar que de las hexosas (obtenidas a partir de la degradación de la sacarosa, en *A. vinelandii*), la fructosa entra directamente a la ruta de síntesis de alginato (*ver figura 2.3*) mientras que la glucosa es catabolizada por la vía Entner-Doudoroff. Esta ruta utiliza una bifurcación, en la cual la reacción de la aldolasa produce piruvato y gliceraldehído-3-fosfato (G-3-P), este último puede entrar inmediatamente a la gluconeogénesis y formar más alginato. A partir de estos resultados Beale y Foster establecen que el 100 % de la fructosa y el 50 % de la glucosa están dirigidos a la formación de alginato. El porcentaje de conversión de sacarosa en alginato fue de 18.7 %, valor calculado a las 27 h del cultivo.

5.2. CULTIVOS EXPONENCIALMENTE ALIMENTADOS (CEA)

Para los cultivos exponencialmente alimentados, realizados por duplicado, la fase de cultivo en lote se inició con una concentración de 2 g L^{-1} de sacarosa. La sacarosa se agotó a las ~ 7 h de cultivo, dando inicio a la etapa de alimentación. Para todas las etapas alimentadas se calculó la relación másica entre el alginato producido y la biomasa generada ($Y_{P/X}$) con el propósito observar el efecto de μ sobre este cociente, el cual se refiere a la cantidad total de alginato producido por unidad celular (a una μ constante).

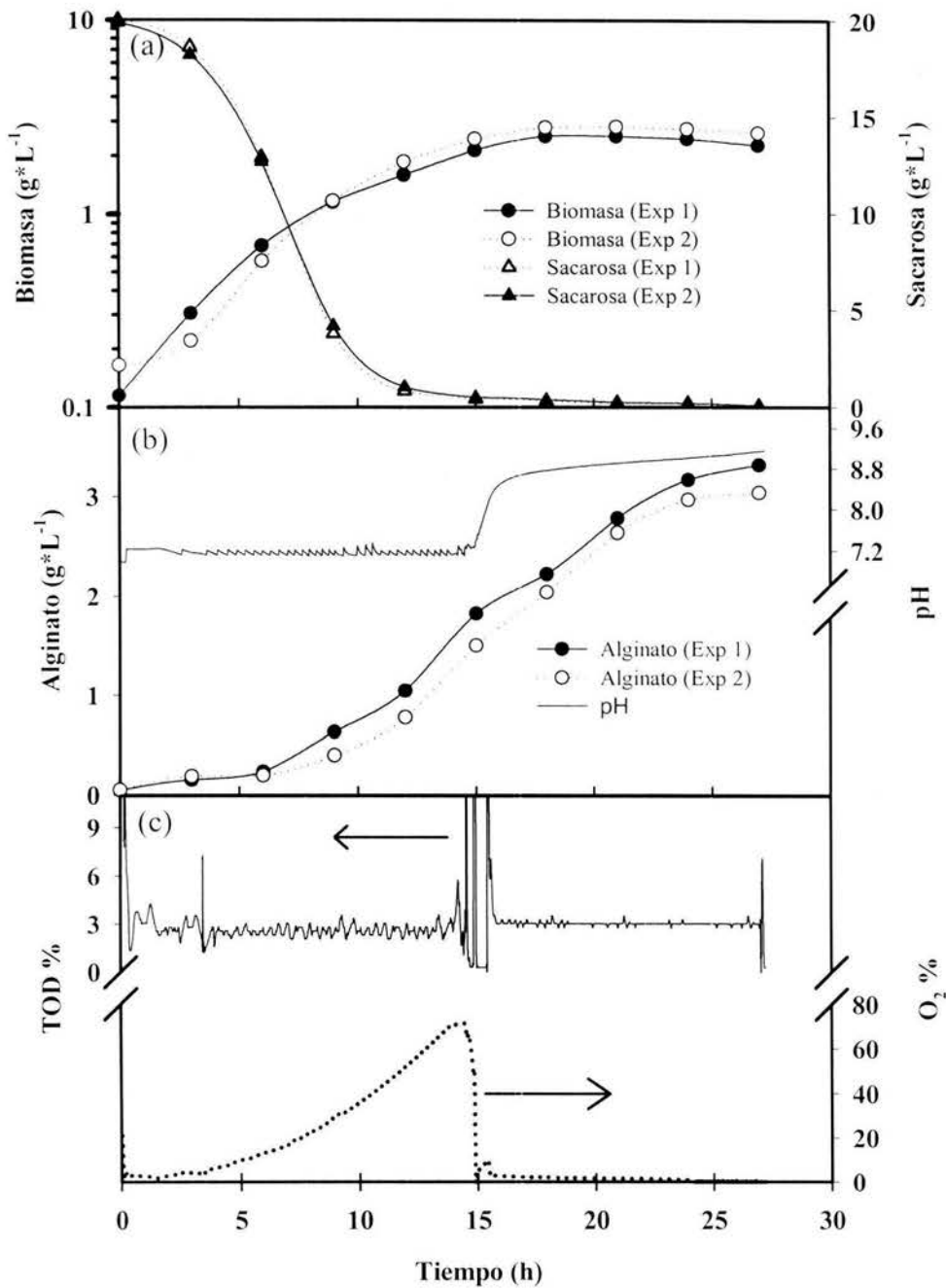


Figura 5.1 Producción de alginato por *A. vinelandii* SML2 en cultivo en lote. (a) Concentración celular y consumo de sacarosa; (b) Producción de alginato y evolución de pH; (c) Control de TOD y porcentaje de apertura de la válvula de oxígeno.

5.2.1. CEA ($\mu = 0.09 \text{ h}^{-1}$)

En la **figura 5.2** se presenta el promedio de los resultados del CEA operado a una μ de 0.09 h^{-1} . En estas gráficas se muestran las barras de desviación que indican los valores máximos y mínimos obtenidos entre réplicas. En algunos casos, las desviaciones son de la misma magnitud del símbolo empleado. Las líneas punteadas verticales indican el tiempo de inicio y final de la etapa de alimentación. La μ fue determinada a partir de la ecuación (6). Las ecuaciones utilizadas para realizar los cálculos de los términos cinéticos se muestran en la sección 4.5 de materiales y métodos.

Como se observa en la **figura 5.2a**, una μ relativamente constante se alcanzó inmediatamente después de la primera etapa en lote ($\sim 7 \text{ h}$), al inicio de la etapa de alimentación. La línea horizontal punteada muestra la condición de estado pseudoestacionario en donde la tasa de crecimiento permanece constante durante la etapa alimentada del proceso (**figura 5.2a**). El estado pseudoestacionario para la sacarosa fue alcanzado inmediatamente después del inicio de la alimentación con valores cercanos a 0.4 g L^{-1} . La concentración más alta de biomasa fue de $2.64 \pm 0.2 \text{ g L}^{-1}$, mientras que el alginato generado fue de $1.4 \pm 0.2 \text{ g L}^{-1}$, valor inferior al obtenido en el cultivo en lote, el cual puede ser explicado por la baja concentración de biomasa producida. El porcentaje de conversión de sacarosa en alginato fue de 26%. 1.4 veces mayor con respecto al cultivo convencional. En la etapa de alimentación, el $Y_{P/X}$ fue de $0.5 \pm 0.1 \text{ g alg/g biomasa}$ y la μ promedio obtenida fue de 0.094 h^{-1} . El tiempo de duplicación bajo estas condiciones fue de 7.4 h. El PMP_M del alginato generado fue tres veces mayor que el alginato sintetizado en el cultivo lote ($275 \pm 35 \text{ KDa}$).

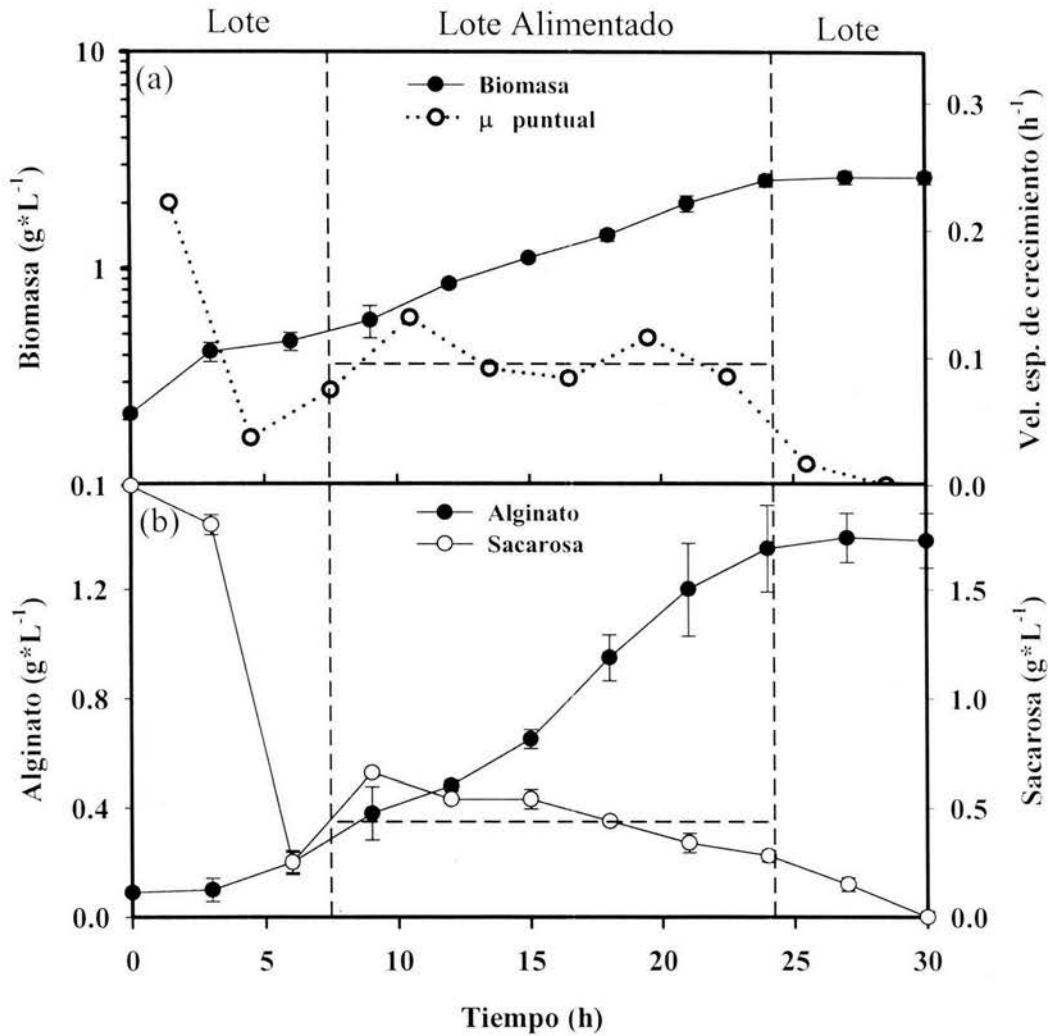


Figura 5.2. Producción de alginato en cultivos exponencialmente alimentados a una $\mu = 0.09 \text{ h}^{-1}$. (a) Concentración de biomasa y μ puntual; (b) Concentración de alginato y sacarosa.

La **figura 5.3a** muestra la concentración de oxígeno en la mezcla de gases de entrada y el perfil de la TOD para el *CEA* mostrado en la **figura 5.2**. Un valor de TOD constante (3 %) se registró durante la etapa de alimentación (**figura 5.3a**). La caída en la concentración de sacarosa (**figura 5.2b**) es seguida por un incremento repentino del pH y la pérdida del

control de TOD debido al cese de la respiración de *A. vinelandii*. Tal señal fue utilizada para iniciar la alimentación. En la *figura 5.3b* se puede observar el incremento exponencial del volumen del medio de cultivo para este experimento.

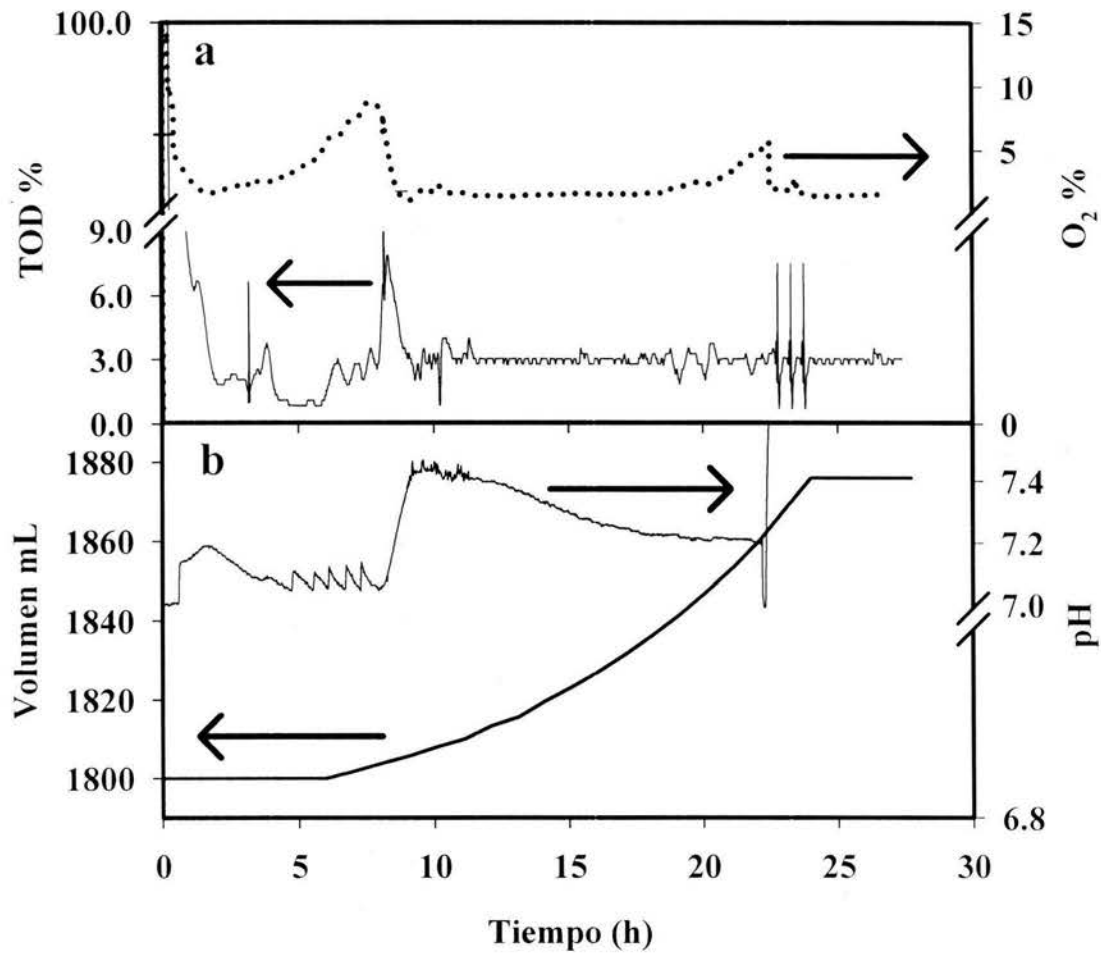


Figura 5.3. TOD y concentración de oxígeno en el gas de entrada (a); Incremento de volumen y comportamiento del pH (b), en cultivos exponencialmente alimentados de *A. vinelandii* a una $\mu = 0.09 \text{ h}^{-1}$.

Se realizó el análisis de los perfiles de distribución de pesos moleculares (cromatogramas) del alginato producido a diferentes tiempos del cultivo (*figura 5.4*). La muestra tomada a

las 6 h (\clubsuit), en la etapa de cultivo en lote, está conformada por dos familias de pesos moleculares bien definidas. El valor de PMP_M para esta distribución es muy similar al PMP_M del exopolisacárido producido en el cultivo en lote (cultivos convencionales). Posteriormente, cuando se fijó la μ a 0.09 h^{-1} (inicio de la etapa de alimentación), se obtuvo una distribución de pesos moleculares relativamente diferente a la obtenida en la etapa del cultivo en lote del proceso. En la distribución de pesos moleculares obtenidas durante la etapa de alimentación (15 h) se aprecia que una nueva familia de alginato de más alto PMP_M (\dagger) se sintetiza. También se observa que una de las familias de alginatos de bajo peso molecular bajo ($\sim 45 \text{ Kda}$, \ddagger) se está “diluyendo” con los alginatos de alto peso molecular ($\sim 125 \text{ Kda}$, \dagger) es por ello que se observa una disminución del área bajo la curva de esta familia en el cromatograma. Por último, en la distribución de pesos moleculares de una muestra tomada al final de la etapa de alimentación, a las 27 h del cultivo ($\mu = 0.09 \text{ h}^{-1}$), se aprecia un claro incremento del área bajo la curva de los alginatos de alto PM (ψ). Trujillo-Roldán *et al.* (2004) demostraron que bajo condiciones bien controladas de TOD, en cultivos en lote de *A. vinelandii* SML2, se obtiene una sola familia de alginatos. En el caso de este CEA (μ de 0.09 h^{-1}), como se ha señalado antes, se aprecian dos familias de alginatos, sin importar que la TOD fue bien controlada durante la etapa de alimentación. Una explicación a este hecho es que el exopolisacárido producido en la etapa de alimentación está mezclado con el alginato sintetizado en la etapa en lote del proceso. Cabe señalar que en la etapa en lote de éste CEA se registró una μ de 0.21 h^{-1} y en esta condición de crecimiento *A. vinelandii* SML2 favorece la producción de alginato de bajo PMP_M ($\sim 45 \text{ KDa}$), tal como fue el caso para cultivos convencionales (en lote).

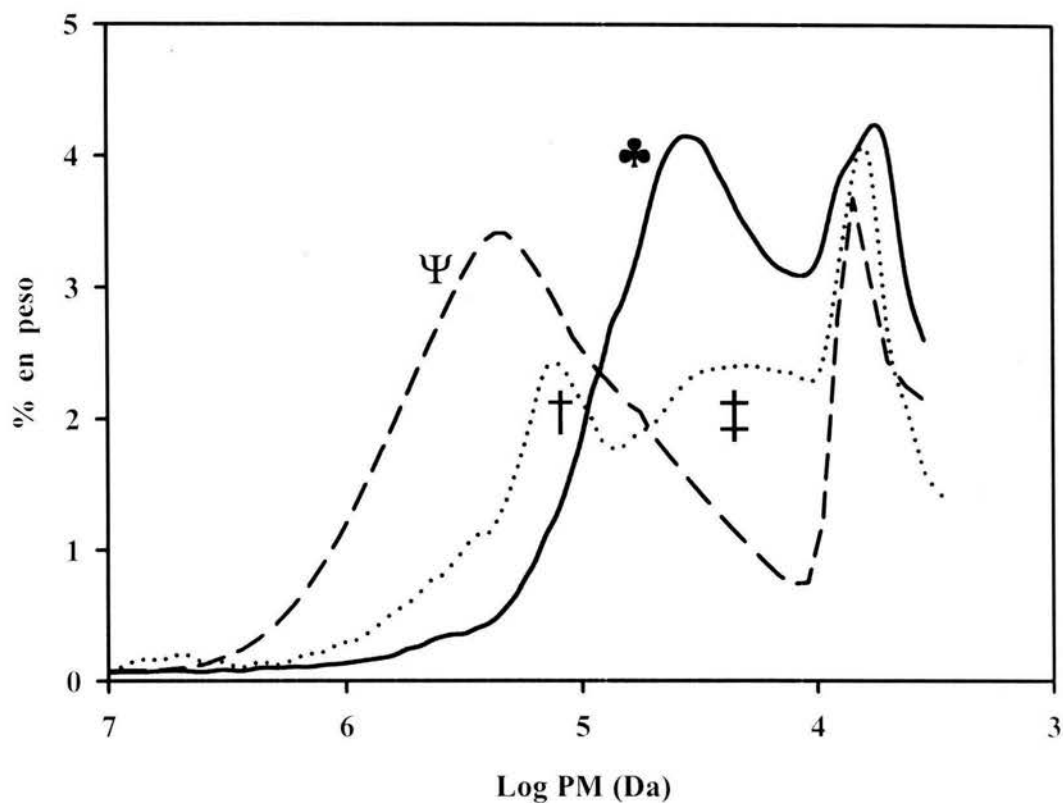


Figura 5.4. Distribuciones del peso molecular del alginato producido por *A. vinelandii* SML2 en el CEA a 0.09 h^{-1} : (—) 6 h, (•••••) 15 h, (-----) 27 h.

La determinación del PMP_M del alginato contenido en una muestra de un CEA está influenciada por el biopolímero producido en la etapa en lote del proceso. Para éste CEA, la relación másica (Alg_A/Alg_L) del alginato producido en la etapa de alimentación (Alg_A) y la del alginato producido en la etapa lote (Alg_L) fue de ~ 2.7 , es decir, se produjo menos alginato en la etapa en lote que en la alimentada. Con el propósito de inferir el efecto del alginato de bajo peso molecular (Alg_L) sobre la distribución de pesos moleculares de las muestras de biopolímero recolectadas en la etapa alimentada se realizó un experimento

(anexo 2), en donde se presentan los resultados del efecto de una mezcla de alginatos de diferentes tallas moleculares sobre la distribución de peso molecular obtenida a partir de esta mezcla y su respectivo valor de PMP_M .

En resumen, bajo éstas condiciones de crecimiento ($\mu = 0.09 \text{ h}^{-1}$) se aprecia claramente que *A. vinelandii SML2* produce alginatos de mayor PMP_M , comparados con los producidos en el cultivo convencional ($\mu = 0.21 \text{ h}^{-1}$).

5.2.2 CEA ($\mu = 0.06 \text{ h}^{-1}$)

Los resultados de este experimento se presentan en la **figura 5.5**. La concentración más alta de biomasa fue de $1.3 \pm 0.1 \text{ g L}^{-1}$ y para el alginato de $1.3 \pm 0.1 \text{ g L}^{-1}$. En la etapa de alimentación, el $Y_{P/X}$ fue de $1.05 \pm 0.1 \text{ g alg/g biomasa}$. La μ promedio obtenida en la fase de alimentación exponencial fue de $0.061 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$. El tiempo de duplicación en este experimento fue de 11.4 h. El valor del PMP_M del alginato sintetizado en este CEA es 7.5 veces mas grande que el obtenido en el cultivo en lote ($705 \pm 147 \text{ KDa}$). De todo el alginato producido en el cultivo la mayor parte del biopolímero sintetizado fue producido en la etapa exponencialmente alimentada (la relación másica Alg_A/Alg_L de la fermentación fue de 2.3). El porcentaje de conversión de sacarosa en alginato fue de 25% muy similar al valor obtenido en el CEA operado a una $\mu = 0.09 \text{ h}^{-1}$.

En la **figura 5.6** se muestra el perfil de las distribuciones de peso molecular de tres muestras de alginato producido en el CEA a 0.06 h^{-1} (6, 15 y 27 h). Se observa un comportamiento similar a los perfiles de las familias de alginato producidos en el CEA

diseñado para dar una μ de 0.09 h^{-1} . La única diferencia relevante es que hay un mayor desplazamiento, hacia la izquierda del cromatograma, de la familia de alginato que se produce en la etapa alimentada de la fermentación, indicando un incremento sustancial en el PMP_M del alginato producido durante el proceso.

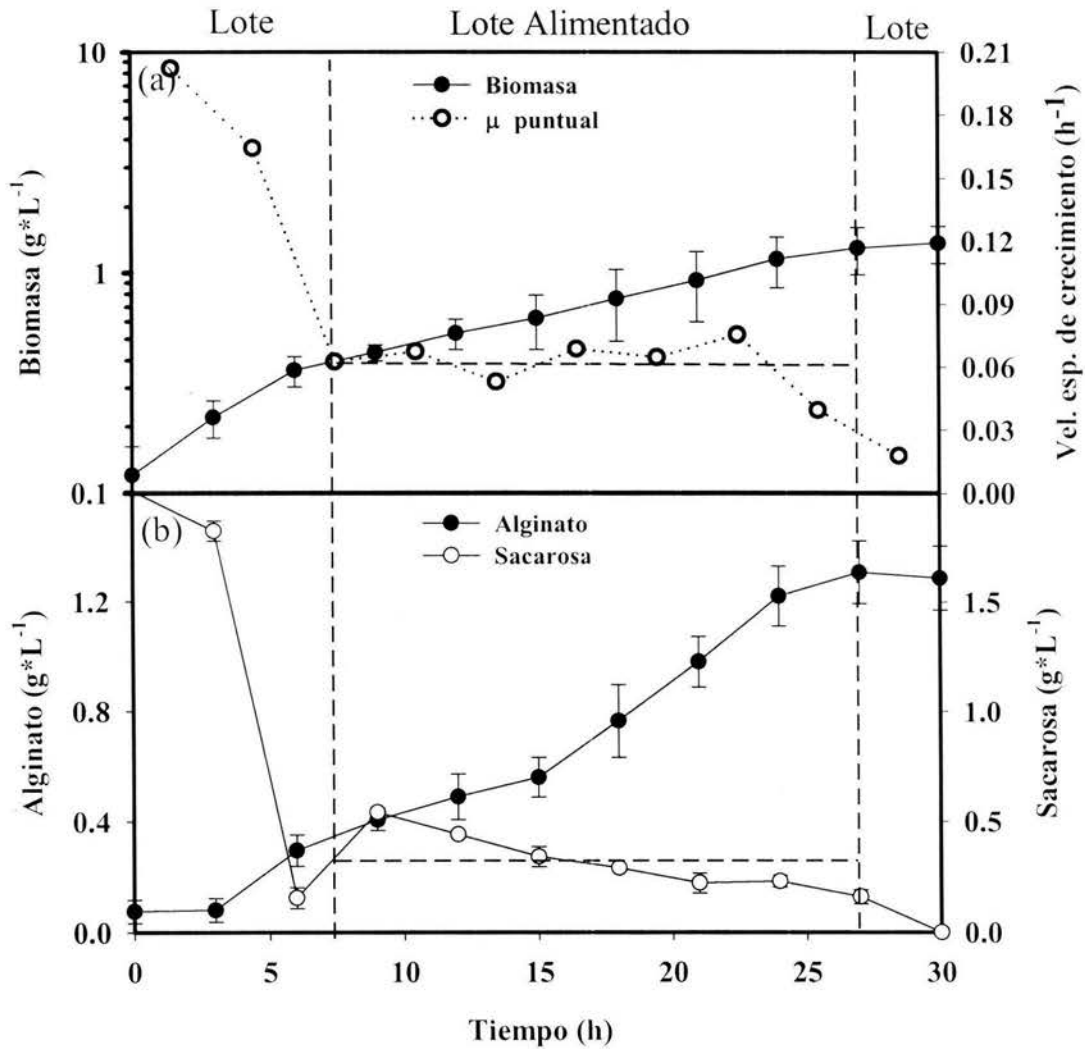


Figura 5.5. Producción de alginato en cultivos exponencialmente alimentados a una $\mu = 0.06 \text{ h}^{-1}$. (a) Concentración de biomasa y μ puntual; (b) Concentración de alginato y sacarosa.

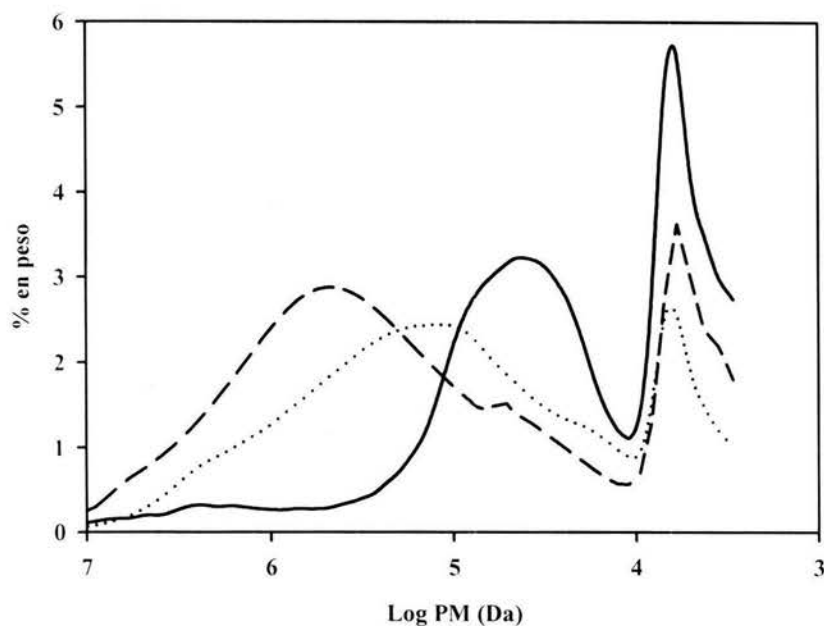


Figura 5.6. Distribuciones del peso molecular del alginato producido por *A. vinelandii* SML2 en el CEA a 0.06 h^{-1} : (—) 6 h, (.....) 15 h, (- - - - -) 27 h.

5.2.3. CEA ($\mu = 0.03 \text{ h}^{-1}$)

Los resultados de este experimento se presentan en la **figura 5.7**. La concentración más alta de biomasa fue de $1.22 \pm 0.2 \text{ g L}^{-1}$ y la del alginato de $2.1 \pm 0.2 \text{ g L}^{-1}$. En este cultivo, el valor del $Y_{p/X}$ se incrementó más de 2 veces ($3.0 \pm 0.2 \text{ g alg/g biomasa}$) con respecto al cultivo operado a 0.06 h^{-1} . La relación másica Alg_A/Alg_L de la fermentación fue de 1.67. El porcentaje de conversión de la fuente de carbono en alginato se incrementó cerca del doble, con respecto a los CEA's operados a 0.06 h^{-1} y 0.09 h^{-1} (del 25 al 45 %). Estos resultados son consistentes con los reportados en sistemas similares. Sengha *et al.* (1989) reportaron un importante incremento en el porcentaje de conversión de glucosa en alginato (20-40 %) en cultivos continuos de *P. mendocina* manejando tasas de dilución por debajo de 0.1 h^{-1} .

En la *figura 5.7b* se observa que la μ promedio obtenida en la fase de alimentación exponencial fue de $0.033 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$. El tiempo de duplicación fue de 21 h. El PMP_M se incrementó ~ 14 veces ($1306 \pm 150 \text{ KDa}$) con respecto al PMP_M del alginato producido en el cultivo en lote. En todos los *CEA*, el control de TOD se mantuvo muy cercano al *set point* ($3 \pm 0.3 \%$). Por otro lado, las μ puntuales obtenidas en la etapa de alimentación, fueron relativamente constantes, al igual que la concentración de sacarosa, lo cual indica una aproximación al estado pseudo-estacionario.

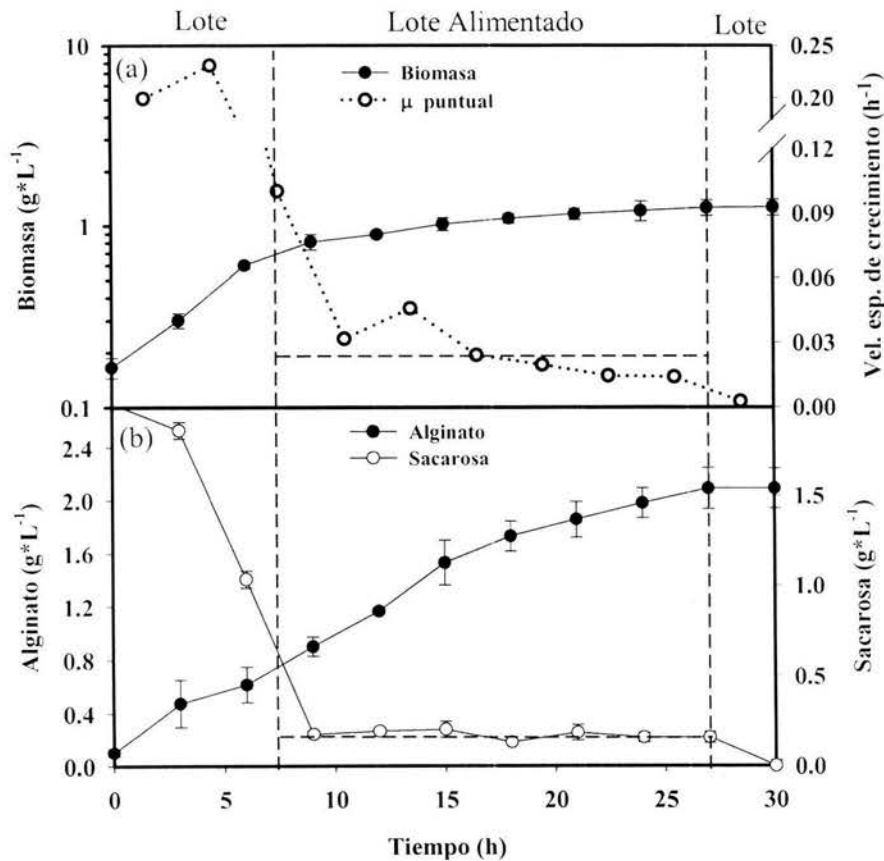


Figura 5.7. Producción de alginato en cultivos exponencialmente alimentados a una $\mu = 0.03 \text{ h}^{-1}$. **(a)** Concentración de biomasa y μ puntual; **(b)** Concentración de alginato y sacarosa.

En la **figura 5.8** se muestra el perfil de las distribuciones de peso molecular de tres muestras de alginato producido en el *CEA* a 0.03 h^{-1} (6, 15 y 27 h). Se observa el mayor desplazamiento hacia la izquierda del cromatograma, de las familias de alginatos obtenidas al final de la fermentación, comparadas con los perfiles de los *CEA*'s desarrollados a μ 's de 0.06 y 0.09 h^{-1} .

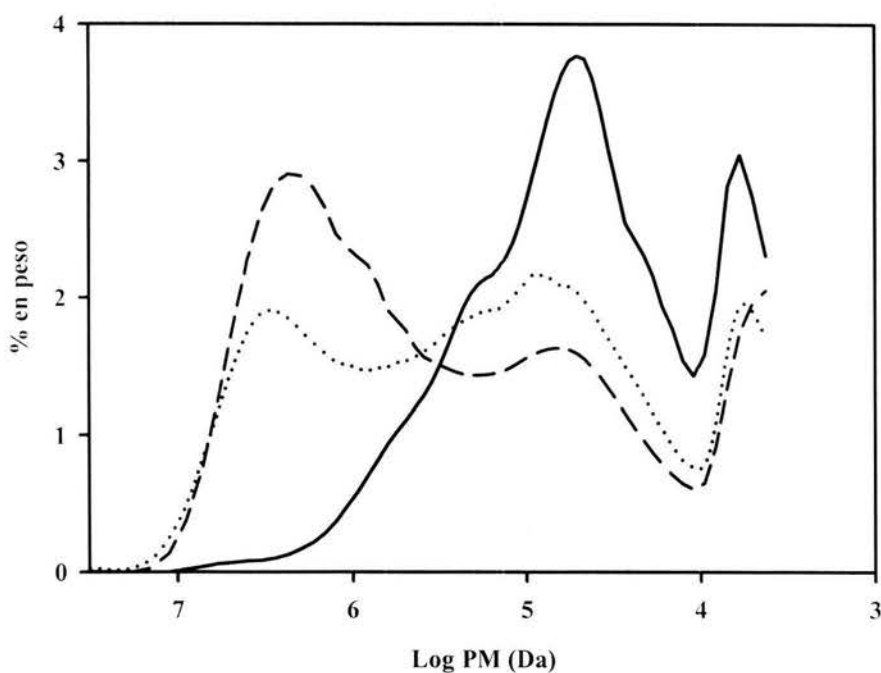


Figura 5.8. Distribuciones del peso molecular del alginato producido por *A. vinelandii* SML2 en el *CEA* a 0.03 h^{-1} : (—) 6 h, (•••••) 15 h, (- - - -) 27 h.

En la **figura 5.9** se muestra un resumen de las distribuciones de peso molecular del alginato producido a las 27 h de cultivo (de los tres *CEA*'s), tiempo en el cual ya se ha sintetizado todo el alginato por *A. vinelandii* SML2 y no se aprecia un cambio en las distribuciones de peso molecular. Estos resultados hacen evidente que la velocidad específica de crecimiento, como parámetro cinético, está impactando fuertemente la talla molecular del

exopolisacárido producido, sugiriendo que condiciones de cultivo que deriven en μ bajas ($0.03 - 0.09 \text{ h}^{-1}$) favorecen la producción de alginatos de mayor peso molecular, con respecto al exopolisacárido producido en procesos donde la tasa de crecimiento del microorganismo es mas alta (por ejemplo: el cultivo en lote, $\mu = 0.21 \text{ h}^{-1}$).

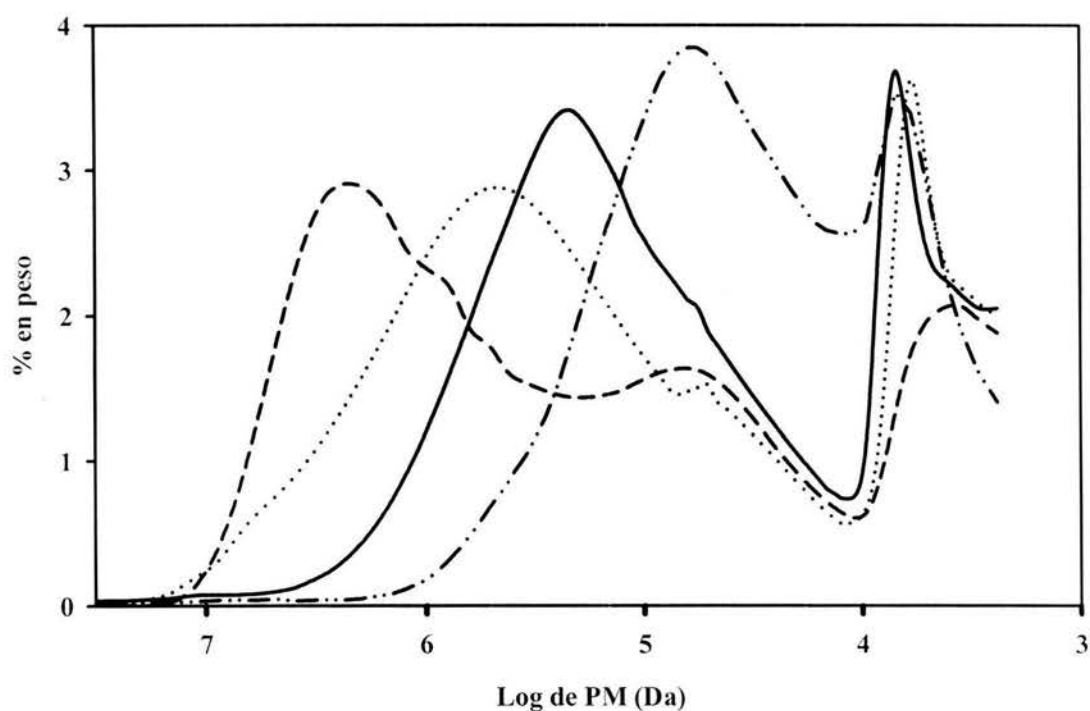


Figura 5.9. Distribuciones del peso molecular del alginato producido por *A. vinelandii*

SML2 en cultivo en lote y los tres *CEA*'s realizados: (—●●—) 0.21 h^{-1} (lote);
(——) 0.09 h^{-1} ; (●●●●) 0.06 h^{-1} ; (----) 0.03 h^{-1} .

En general, los resultados indican (**figura 5.10**) que el $Y_{P/X}$ ' aumenta cuando el cultivo se desarrolla a velocidades específicas de crecimiento bajas. En la literatura disponible en la

actualidad, no hay trabajos que reporten $Y_{P/X}$ superiores a 1.5 en la producción de alginato por *A. vinelandii*, en fermentaciones llevadas a cabo en biorreactor y en matraces. Sin embargo, en el CEA controlado a una μ de 0.03 h^{-1} , de este trabajo se obtiene un $Y_{P/X}$ de casi dos veces más que lo reportado en la literatura.

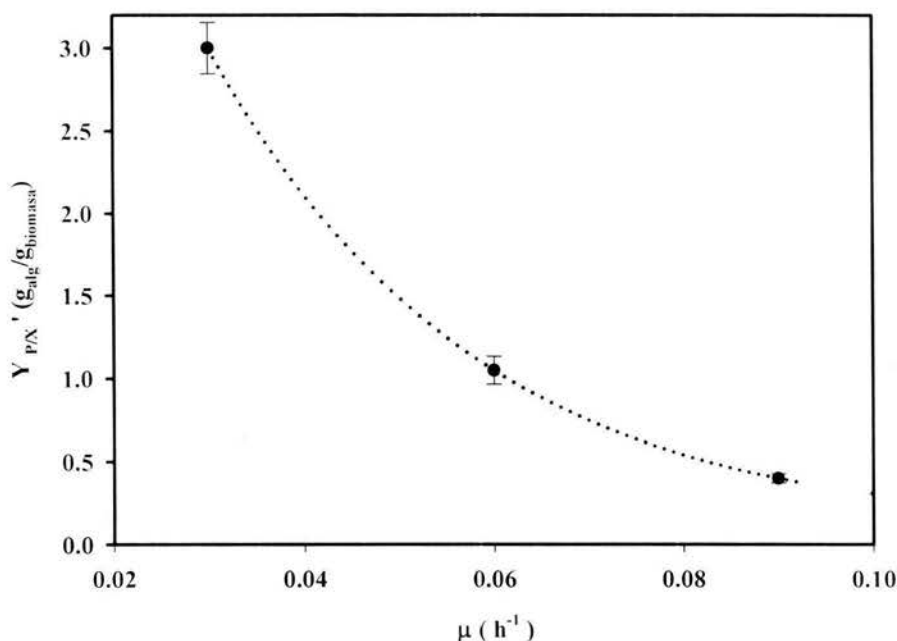


Figura 5.10. Relación del alginato sintetizado con base en biomasa en CEA's (●) de *A. vinelandii* SML2 como función de la μ .

Con respecto a lo antes mencionado, Jarman *et al.* (1978); Jarman (1979); Annison y Couperwhite (1986), al limitar el crecimiento de *A. vinelandii* por deficiencia de nitrógeno en cultivos continuos, reportaron que la biomasa no se vio afectada cuando los cultivos fueron desarrollados a tasas de dilución inferiores a 0.1 h^{-1} ; sin embargo, la producción de alginato se incrementó cuando la D disminuyó. Por lo tanto, la relación de producto con

base en biomasa ($Y_{P/X}$) obtenidos en esos trabajos (aunque no son reportados) se incrementaron cuando la velocidad específica de crecimiento de *A. vinelandii* fue menor a 0.1 h^{-1} . Los resultados reportados en esta tesis son consistentes con los anteriores trabajos (ver **tabla 5.1**). Con respecto al $Y_{P/X}$, el cultivo operado a $\mu = 0.03 \text{ h}^{-1}$ muestra un incremento significativo, con respecto a los cultivos realizados a $\mu = 0.09$ y 0.06 h^{-1} (**tabla 5.1**).

Tabla 5.1. Resumen de los parámetros cinéticos obtenidos en este trabajo, en la etapa alimentada de cada fermentación, para las diferentes condiciones de cultivo evaluadas.

<i>CEA</i>	BIOMASA (g/L)	ALGINATO (g/L)	$Y_{P/X}$ (g alg/g bio)	PMP _M (KDa)
$\mu = 0.09 \text{ h}^{-1}$	1.4 ± 0.2	1.36 ± 0.2	0.45 ± 0.2	275 ± 35
$\mu = 0.06 \text{ h}^{-1}$	1.3 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.05 ± 0.1	705 ± 147
$\mu = 0.03 \text{ h}^{-1}$	1.0 ± 0.2	2.1 ± 0.2	3.0 ± 0.2	1306 ± 150

Annison y Couperwhite (1986) investigaron la producción de alginato por *A. vinelandii* en cultivos continuos limitados por fosfatos y concluyeron que el $Y_{P/X}$ no fue influenciado por el grado de la limitación. Sin embargo el rango de μ que fue evaluado solo se incluye un dato por debajo de 0.1 h^{-1} . Nosotros demostramos que el principal efecto de μ sobre el $Y_{P/X}$ está por debajo de 0.1 h^{-1} .

Deavin *et al.* (1977) reportaron cultivos continuos de *A. vinelandii* en donde se evaluó el efecto de D ($0.05-0.1 \text{ h}^{-1}$) sobre la concentración de biomasa y de alginato. Ellos observaron que cuando se disminuía la tasa de dilución, se incrementaba la concentración de alginato. En contraste, en este trabajo se observa que la concentración de alginato no está aparentemente relacionada con éste parámetro cinético (μ), tal parece que lo más importante para el microorganismo es el tipo de biopolímero que sintetiza (específicamente la talla molecular) antes que la cantidad en masa del mismo.

El PMP_M (*figura 5.11*) aumentó conforme la μ de *A. vinelandii SML2* disminuyó. Ello sugiere que el microorganismo produce alginatos de alto peso molecular cuando está sometido a condiciones limitantes de crecimiento. Trujillo-Roldán *et al.* (2003b) reportaron que el PMP_M del alginato producido por *A. vinelandii* en cultivos en lote es función de la TOD (otro factor limitante del crecimiento del microorganismo): pequeñas variaciones en TOD condujeron a la síntesis de alginatos de diferentes PMP_M . Trujillo-Roldán *et al.* (2004) propusieron que este comportamiento puede ser debido a un mecanismo de regulación celular por un sistema de dos componentes, en donde la señal activadora de la regulación está relacionada con la concentración de oxígeno disuelto y/o otros componentes del medio de cultivo.

En trabajos recientes, Reyes (2003) reporta la producción de alginato de *A. vinelandii* en cultivos en biorreactor manipulando la potencia inicial suministrada al sistema. Él demostró que la velocidad específica de crecimiento disminuye conforme la potencia inicial

suministrada es menor. Por otro lado, se observaron altos PMP_M cuando se disminuyó la potencia suministrada al sistema, obteniendo una correlación lineal inversa entre la μ y el PMP_M del alginato producido. Cabe señalar, sin embargo, que ese trabajo experimental no fue diseñado para determinar el efecto de μ sobre el PMP_M . Los resultados de Reyes (2003) y los presentados en este trabajo sugieren que, independientemente de la estrategia que se utilice para manipular la μ de la bacteria, éste parámetro fisiológico estará definiendo la talla molecular del alginato sintetizado por *A. vinelandii*.

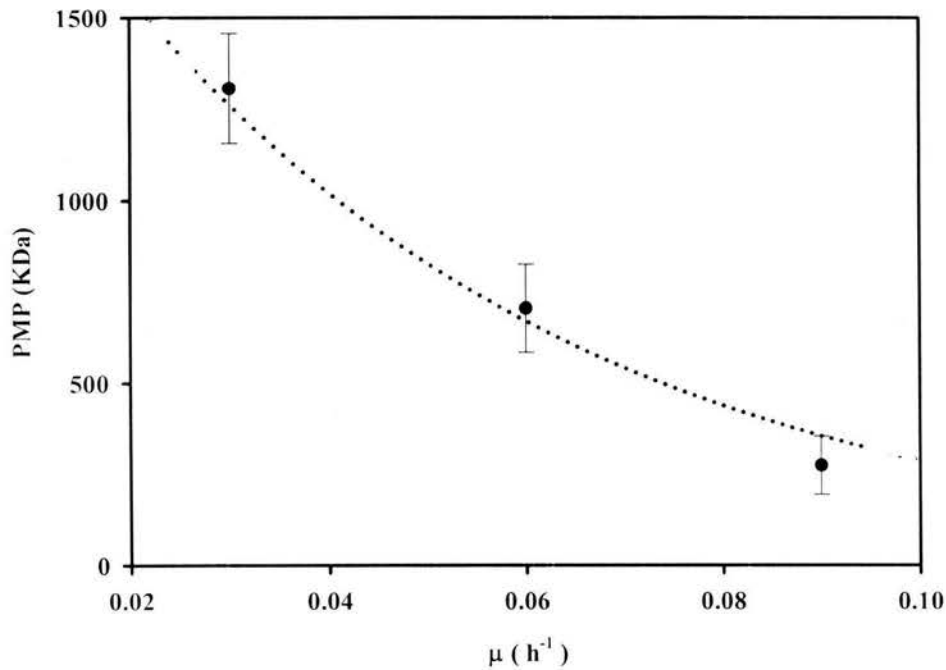


Figura 5.11. PMP_M de alginato producido por *A. vinelandii* SML2 en CEA's (●) como función de la μ .

En resumen, las estrategias de cultivo que tengan como función objetivo la producción de alginato de un determinado peso molecular, deberán contemplar en su diseño el manejo

racional de por lo menos dos factores que afectan esta función objetivo: la tensión de oxígeno disuelto y la velocidad específica de crecimiento.

Desde el punto de vista genético, para el caso de la velocidad específica de crecimiento, Espín (2002) ha reportado que los genes de la biosíntesis de alginato están regulados por el factor sigma RpoS que responde a condiciones de limitación de nutrientes (como la fuente de carbono). De esta manera, su actividad es mayor a bajas μ 's y/o en fase estacionaria. Por lo anterior podemos sugerir que el incremento en el $Y_{P/X}$ ' (en los CEA's operados a $\mu < 0.06 \text{ h}^{-1}$) se explica por la regulación positiva que efectúa RpoS sobre los genes de la síntesis de alginato en *A. vinelandii*.

Costerton *et al.* (1995) postularon que en ambientes donde hay limitaciones nutricionales, es una ventaja crecer formando agregados ó biopelículas. Estas estructuras se caracterizan por una cooperatividad fisiológica, constituyendo una comunidad funcional coordinada que haría a la comunidad microbiana más eficiente que las células individuales. La producción de sustancias poliméricas extracelulares (por ejemplo: exopolisacáridos) por las bacterias que se encuentran dentro de las biopelículas puede estar participando en la unión inicial de la bacteria a superficies u otras células, en la formación y mantenimiento de la estructura del agregado, en el aumento de la resistencia al estrés ambiental y en la nutrición del microorganismo (Stoodley *et al.* 2002). De esta forma, *A. vinelandii* podría estar regulando la cantidad y el tipo de alginato que le será más útil para contender con una condición de limitación nutricional. Datos no publicados en nuestro grupo de investigación (comunicación personal del Dr. Carlos Peña y del MC César Reyes), indican que el

aumento del PMP_M del alginato producido por *A. vinelandii* parece estar relacionado con el incremento del tamaño del agregado en condiciones de baja agitación. Ello sugiere que alginatos de alto peso molecular, como los sintetizados por *A. vinelandii* en los CEA's a 0.03 h^{-1} , podrían estar vinculados con la estructuración y crecimiento de agregados celulares.

CAPITULO VI

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 CONCLUSIONES

- Se logró montar un sistema de cultivo exponencialmente alimentado que permitió cultivar a *A. vinelandii* utilizando velocidades específicas de crecimiento bajas ($0.03-0.09 \text{ h}^{-1}$).
- La concentración final de alginato producido por *A. vinelandii SML2* no es función de la velocidad específica de crecimiento del microorganismo.
- El $Y_{P/X}'$ y el PMP_M del alginato sintetizado están determinados por la velocidad específica de crecimiento de *A. vinelandii SML2*. Se observaron incrementos de 3 y 15 veces (para $Y_{P/X}'$ y PMP_M) respectivamente, cuando la μ se disminuyó a valores de 0.03 h^{-1} , con respecto a cultivos en lote ($\mu = 0.22 \text{ h}^{-1}$).
- Es posible manipular las condiciones de cultivo para obtener alginatos de características determinadas, específicamente la obtención de biopolímeros de diferentes PMP_M .
- *A. vinelandii* sintetiza alginatos de alto PMP_M como una respuesta de adaptación a condiciones limitantes del crecimiento.

6.2 RECOMENDACIONES

En el caso de los cultivos exponencialmente alimentados, la concentración de alginato es baja, situación que obliga a buscar una estrategia que permita aumentar dicha concentración. Se recomienda realizar estudios con el propósito de comenzar el *CEA* con una alta concentración celular. Suponiendo que el $Y_{P/X}$ se mantuviera en estas condiciones, se esperaría que la concentración de alginato aumentara en proporción a la de biomasa.

CAPÍTULO VII

BIBLIOGRAFÍA

- Annison, G., Couperwhite, L. (1986). Effect of limiting substrate concentration, growth rate and aeration on alginate composition and production by *Azotobacter vinelandii* in continuous culture. *Food Hydrocolloids* 1:101-111.
- Beale, J. R., Foster, J. L. (1996). Carbohydrate fluxes into alginate biosynthesis in *Azotobacter vinelandii* NCIB 8789: NMR investigations of the triose pools. *Biochemistry* 35: 4492-4501.
- Boswell, C. (2002). Producers seek price increases in the mature alginates market. *Chem Market Reporter* 262 (18): 10-11.
- Brivonese, A., Sutherland, I. W. (1989). Polymer production by a mucoid strain of *Azotobacter vinelandii* in batch culture. *Applied Microbiology and Biotechnology* 30: 97-102.
- Campos, M. E., J. M. Martínez-Salazar, L. Lloret, S. Moreno, C. Núñez, G. Espín, G. Soberón-Chávez. (1996). Characterization of the gene coding for GDP-mannose dehydrogenase (algD) from *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology* 178:1793-1799.
- Costerton, J., Lewandowski, Z., Caldwell, D., Korber, D., Lappin-Scott, H. (1995). Microbial biofilms. *Annual Reviews of Microbiology* 49: 711-745.
- Clementi, F. Paolo, F., Mancini, F., Moresi, M. (1995). Optimal conditions for alginate production by *Azotobacter vinelandii*. *Enzyme and Microbial Technology* 17:983-988.
- Clementi, F., Mancini M., Moresi M. (1998). Rheology of alginate from *Azotobacter vinelandii* in aqueous dispersions. *Journal of Food Engineering* 36: 51-62.

- Clementi, F., Crudele, M. A., Parente, E., Mancini, M., Moresi, M. (1999). Production and characterization of alginate from *Azotobacter vinelandii*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79: 602-610.
- Chen, W. P., Chen, J. Y., Chang, S. C., Su, C. L. (1985). Bacterial alginate produced by a mutant of *Azotobacter vinelandii*. *Applied and Environmental Microbiology* 49:543-546.
- Davidson, I. W., Sutherland, I. W. Lawson, C. J. (1977). Localization of O-acetyl groups of bacterial alginate. *Journal of General Microbiology* 98:603-606.
- Deavin, L., Jarman, T. R., Lawson, C. J., Righelato, R., Slocombe, S. (1977). The production of alginic acid by *Azotobacter vinelandii* in batch and continuous culture. In: *Extracellular Microbial Polysaccharides*. P. A. Sanford & A. Laskin (Eds). Washington, American Chemical Society. pp. 14-16.
- Doran, P. M. (1995). *Bioprocess Engineering Principles*. Academic Press, London. pp. 359-361.
- Draget, K. I., Smidsrod, O., Skjå -Braek, G. (2001). Alginates from algae. In: *Biopolymers*. De Baets, S., Vandamme, E., Steinbüchel, A. (Eds). Wiley-VCH. Volume 6, pp. 215-242.
- Ertesvåg, H., Valla, S., Skjåk-Braek, G. (1996). Genetic and biosynthesis of alginate. *Carbohydrate Europe* 14: 14-18.
- Espín, G. (2002). Biología de *Azotobacter vinelandii*. En: *Microbios en línea*. <http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/index.html>. ISBN 968-36-8879-9.
- Gacesa, P. (1998). Bacterial alginate biosynthesis- Recent progress and future prospects. *Microbiology* 114:1133-1143.
- Gorin, P.A. Spencer, J. F. T. (1966). Exocellular alginic acid from *Azotobacter vinelandii*. *Canadian Journal of Chemistry* 44: 993-998.

- Hernández-Carmona, G., McHugh, D. J., Arvizu-Higuera, D. L., Rodríguez-Montesinos, Y. E. (1999a). Pilot plant scale extraction of alginate from *Macrocystis pyrifera*. Part 1. The effect of pre-extraction treatments on the yield and quality of alginate. *Journal of Applied Phycology* 10 (6): 507-513.
- Hernández-Carmona, G., McHugh, D. J., López-Gutiérrez, F. (1999b). Pilot plant scale extraction of alginate from *Macrocystis pyrifera*. Part 2. Studies on extraction conditions and methods of separating the alkaline-insoluble residue. *Journal of Applied Phycology* 11: 493-502.
- 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 *Azotobacter vinelandii* and the enzymes involved in its biosynthesis. *Journal of General Microbiology* 127: 185-191.
- Horan, N. J., Jarman, T. R., Dawes, E. A. (1983). Studies of some enzymes of alginic acid biosynthesis in *Azotobacter vinelandii* grown in continuous culture. *Journal of General Microbiology* 129: 2985-2990.
- Jarman, T. R., Deavin, L., Slocombe, S., Righelato, R. C. (1978). Investigation of the effect of environmental conditions on the rate of exopolysaccharide synthesis in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of General Microbiology* 107:59-64.
- Jarman, T. R. (1979). Bacterial alginate synthesis, In: *Microbial Polysaccharides and Polysaccharases*. RC Berkeley, GW Gooday, DC Ellwood, (Eds.), Academic Press. London, New York, San Francisco, pp. 35-50.
- Kennedy, C., Toukdarian, A. (1987). Genetics of *Azotobacter*: applications to nitrogen fixation and related aspects of metabolism. *Annual Reviews of Microbiology* 41:227-258.

- Kuhla, J., Oelze, J. (1988). Dependency of growth yield, maintenance and K_s values on the dissolved oxygen concentration in continuous cultures of *Azotobacter vinelandii*. *Archives in Microbiology* **149**: 509-514.
- Lloret, L. Barreto, R., Campos, M. E., Martínez-Salazar, J. M., Moreno, S., Espin, G., Soberón-Chávez, G. (1996). Genetic analysis of transcriptional arrangement of *Azotobacter vinelandii* alginate biosynthetic genes: identification of two promoters. *Molecular Microbiology* **21**: 449-457.
- López-Munguía, A., Brito, E., Galindo, E. (1993). Biopolímeros. En: *Biotecnología Alimentaria*. García-Garibay, Quintero-Ramírez y López-Munguía (Coordinadores). Ed. Limusa. Cap. 13, pp. 423-451.
- Lynn, A. N., Sokatch, J. R. (1984). Incorporation of isotope from specially labeled glucose into alginates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology* **158**(3): 1161-1162.
- McHugh, D. (2002). La industria de las algas marinas. En: *Perspectivas para la producción de algas marinas en los países en desarrollo*. FAO circular de pesca, No. 968. Roma.
- Mejía-Ruiz, H, S. Moreno, J. Guzmán, R. Nájera, R. León, G. Soberón-Chávez, G. Espín. (1997). Isolation and characterization of an *Azotobacter vinelandii* *algK* mutant. *FEMS Microbiology Letters* **156**:101-106.
- Miranda, L. (1998). Evaluación de cepas mutantes de *Azotobacter vinelandii* en la producción de alginatos. *Tesis de Licenciatura*, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Facultad de Química.
- Moe, S.T., Draget, K. I., Skjå -Braek, G., Smidsro, O. (1995). Alginates, In: *Food Polysaccharides and Applications*. A.M. Stephen, (Ed.), Marcel Dekker, New York. Chap. 9, pp. 245-286.

- Otterlei, M., Ostgaard, K., Skajak-Braek, G., Smidsrod, O., Soon-Shiong, P., Espevik, T. (1991). Introduction of cytokine production from human monocytes stimulated with alginate. *Journal of Immunotherapy* 10: 286-291
- Page, W. J., and H. L. Sadoff. (1975). Relationship between calcium and uronic acids in the encystment of *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology* 122:145-151.
- Parente, E., Crudele, M. A., Aquino, M., Clementi, F. (1998). Alginate production by *Azotobacter vinelandii* DSM576 in batch fermentation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 20: 171-176.
- Peña, C., Campos, N., Galindo, E. (1997). Changes in alginate molecular mass distributions, broth viscosity and morphology of *Azotobacter vinelandii* cultured in shaken flasks. *Applied Microbiology and Biotechnology* 253: 31-36.
- Peña, C. (1998). Producción de alginatos bacterianos por fermentación líquida: estudio de los factores determinantes en la biosíntesis y composición del alginato producido por *Azotobacter vinelandii*. *Tesis de Doctorado*, Instituto de Biotecnología, UNAM.
- Peña, C. Trujillo-Roldan, M. A. Galindo, E. (2000). Influence of dissolved oxygen tension and agitation speed on alginate production and its molecular weight in cultures of *Azotobacter vinelandii*. *Enzyme and Microbiology Technology* 27: 390-398.
- Pindar, D. F., Bucke, C. (1975). The biosynthesis of alginic acid by *Azotobacter vinelandii*. *Biochemical Journal* 152(3): 617-622.
- Pirt, S. J. (1974). The theory of fed-batch culture with reference to the penicillin fermentation. *Journal of Applied Chemical Biotechnology* 24:415-424.
- Pszczola, D. E. (1998). Discovering treasures of the deep. *Food Technology* 52, 4:74-80.

- Ramírez, O. T., Zamora, R., Quintero, R., López-Munguía A. (1994). Exponentially fed-batch cultures as an alternative to chemostats: the case of penicillin acylase production by recombinant *E. coli*. *Enzyme and Microbiology Technology* 16:895-903.
- Rehm, B. H., Valla, S. (1997). Bacterial alginates. Biosynthesis and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 48:281-288.
- Reyes, C. (2003). Escalamiento –de matraz a fermentador de laboratorio- de la producción de alginatos por *Azotobacter vinelandii*. *Tesis de Maestría*. Instituto de Biotecnología, UNAM.
- Sabra, W., Zeng, A.P., Deckwer W.D. (2001). Bacterial alginate: physiology, product quality and process aspects. *Applied Microbiology and Biotechnology* 56: 315-325.
- Seáñez, G., Peña, C., Galindo, E. (2001). High CO₂ affects alginate production and prevents polymer degradation in cultures of *Azotobacter vinelandii*. *Enzyme and Microbiology Technology* 29: 535-540.
- Sengha, S. S., Anderson, A. J., Hacking, A. J., Dawes E. A. (1989). The production of alginate by *Pseudomonas mendocina* in batch and continuous culture. *Journal of General Microbiology* 135:795-804.
- Skjak-Braek, G. (1992). Alginate: biosynthesis and some structure function relationships relevant to biomedical and biotechnological applications. *Transactions-Biochemical Society* 20: 27-33.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D., Costerton, W. J. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Review Microbiology* 56: 187-209.
- Sutherland, I. W. (1990). *Biotechnology of Microbial Exopolysaccharides*. Cambridge University Press, 156 pp.

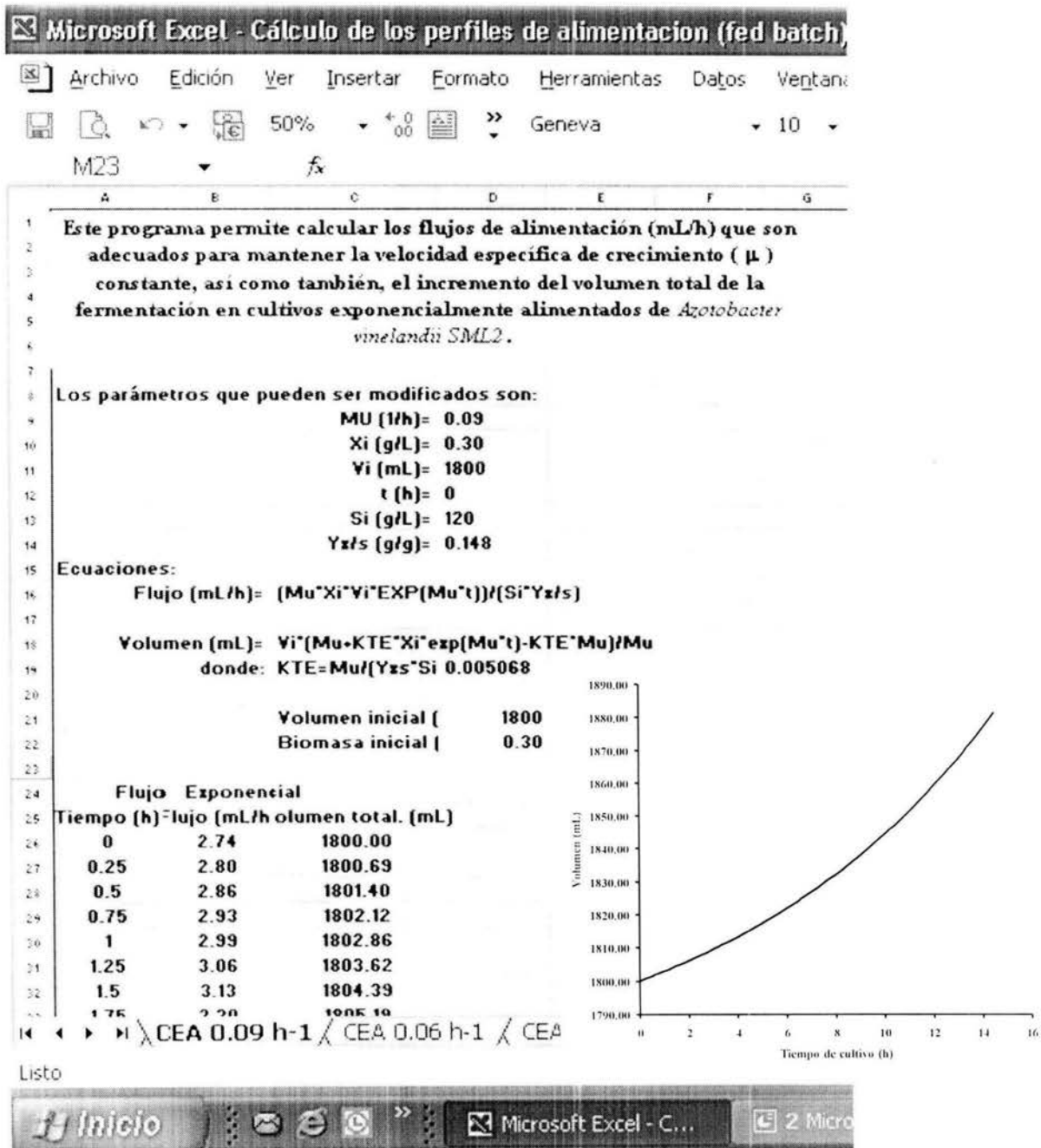
- Sutherland, W. Y., Tait, Y. M. (1994). Structure-function relationships in microbial exopolysaccharides. *Biotechnology Advances* 12:393-448.
- Tinoco, J. R. (1993). Obtención de alginatos bacterianos por fermentación líquida de *Azotobacter vinelandii*. *Tesis de Maestría en Biotecnología*. Instituto de Biotecnología, UNAM.
- Trujillo, M. A. (1999). Efecto de las oscilaciones en el oxígeno disuelto sobre la producción de alginatos por *Azotobacter vinelandii*. *Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas*. Instituto de Biotecnología, UNAM.
- Trujillo-Roldan, M. A., Peña, C., Ramírez, O. T., Galindo, E. (2001). Effect of oscillating dissolved oxygen tension on the production of alginate by *Azotobacter vinelandii* *Biotechnology Progress* 17: 1042-1048.
- Trujillo-Roldán, M. A., Peña, C., Galindo, E. (2003a). Components in the inoculum determine the kinetics of *Azotobacter vinelandii* cultures and the molecular weight of its alginate. *Biotechnology Letters* 25: 1251-1254.
- Trujillo-Roldán, M.A., Moreno, S., Galindo, E., Espín, G. (2003b). Alginate production by an *Azotobacter vinelandii* mutant unable to produce alginate lyase. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60: 733-737
- Trujillo-Roldán, M.A., Moreno, S., Espín, G., Galindo, E. (2004). Roles of the polymerase complex and alginate-lyase in determining the molecular weight of alginate produced by *Azotobacter vinelandii*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 63: 742-747.
- Vandeska, E., Amartey, S., Kuzmanova, S., Jeffries, T. W. (1996). Fed-batch culture for xylitol production by *Candida boidinii*. *Process Biochemistry* 31:265-270.
- Wong, T. Y., Preston, L. A., Schiller, N. L. (2000). Alginate lyase: A review of major sources and enzyme characteristics, structure-function analysis, biological roles and applications. *Annual Review Microbiology* 54: 289-340.

- Yamane, T., K. Shimizu, S. (1984). Fed-batch techniques in microbial processes. *Journal of Biochemical Engineering and Biotechnology* 30:145-194.
- Youssef, F., Roukas, T., Biliaderis, C. G. (1999). Pullulan production by a non-pigmented strain of *Aureobasidium pullulans* using batch and fed-batch culture. *Process Biochemistry* 34:355-366.

ANEXOS

1. Ejemplo del programa para calcular los flujos de alimentación (mL/h) y el volumen total de la fermentación que se requieren para mantener la velocidad específica de crecimiento (μ) constante.
2. Análisis de la distribución de pesos moleculares de una mezcla de alginatos algales de diferente peso molecular y su efecto sobre el valor de PMP_M del alginato total.

1. Programa de alimentación



2. Analisis de alginatos algales de diferentes pesos moleculares

Con el propósito de inferir el efecto de alginato de bajo peso molecular (Alg_L) producido en la etapa en lote de los cultivos *CEA* sobre el PMP_M de alginato total ($Alg_A + Alg_L$) de estos procesos de fermentación, se preparó una mezcla de alginatos algales de diferente peso molecular (alginato de alto y bajo peso molecular, relación 1:1 m/m), a la cual se le determinó el PMP_M . La *figura A.1* muestra las distribuciones de peso molecular de cada tipo de alginato y su mezcla. Los PMP_M obtenidos fueron de 550 KDa para el alginato de bajo PM, 874 KDa para el alginato de alto PM y el de la mezcla fue de 645 KDa.

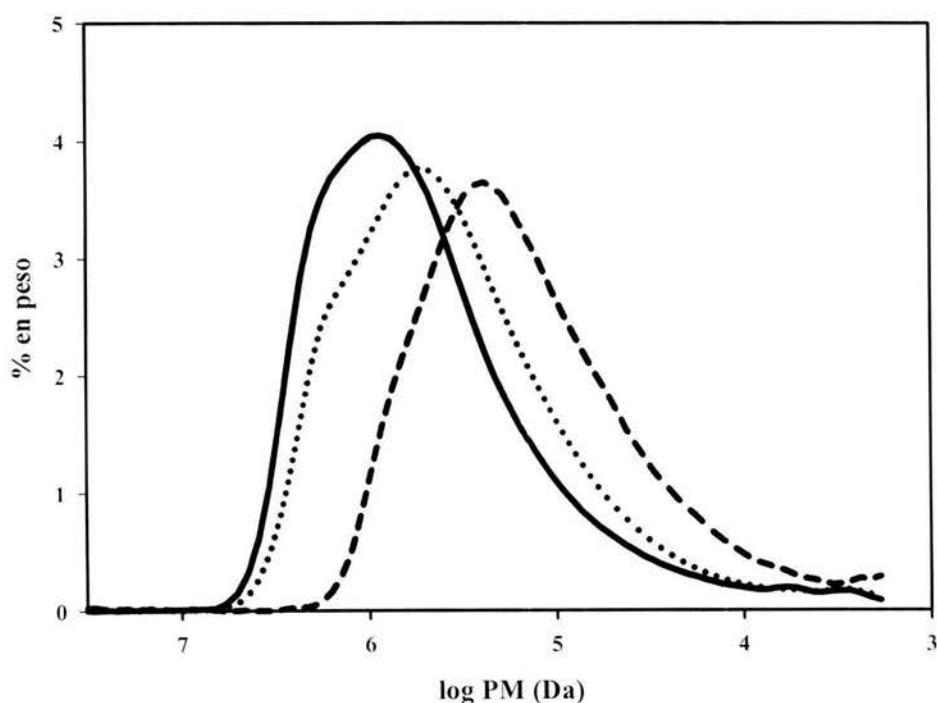


Figura A.1. Distribución del peso molecular de alginato algal. Alginato de bajo PM (— · —); alginato de alto PM (—); mezcla de alginatos (.....).

El PMP_M de la mezcla de alginatos está por debajo del promedio aritmético de los PMP_M de los alginatos de alto y bajo PM. Ello indica que el efecto del alginato de bajo PM impacta en mayor proporción a la distribución de los pesos moleculares, en condiciones de igual concentración. Esto sugiere que el valor real PMP_M del alginato producido en la etapa de alimentación (de los *CEAs* realizados en este trabajo) podría ser mas alto si se considera el efecto de “dilución” que tiene sobre él, el alginato producido en la etapa en lote.