



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**



**Instituto de Biotecnología  
Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis**

Estudio de la producción de alginato por *Azotobacter vinelandii* bajo  
condiciones de limitación de oxígeno

**TESIS**  
PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PRESENTA  
M. en C. ALVARO ENRIQUE DÍAZ BARRERA

OCTUBRE 2007



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.

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. Enrique Galindo Fentanes. Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo de una beca de Doctorado de la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP-UNAM) y el apoyo económico de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) a través del proyecto IN 230407. También se contó con el apoyo de una beca complementaria de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso-Chile.

*A Verónica por el amor que nos tenemos y gracias por su apoyo incondicional*

*A Vicentito quien es la luz de mi vida*

Al Dr. Enrique Galindo por confiar en mí, apoyarme incondicionalmente para que pudiera ingresar al doctorado y permitirme ingresar a su grupo. Muchas gracias por su valiosa enseñanza, confianza y apoyo, sobretodo en los momentos más difíciles.

Al Dr. Carlos Peña por apoyarme en numerosas ocasiones y por la constante discusión e ideas aportadas durante la realización de este proyecto.

A los miembros del comité tutorial, Dres. Guadalupe Espin y Gerardo Saucedo, por su valioso apoyo y discusión durante el desarrollo de este proyecto.

A los miembros del Jurado, por sus valiosos comentarios:

Dr. Alfredo Martínez

Dr. Enrique Galindo

Dr. Mario Soberón

Dr. Daniel Segura

Dr. Felipe López

Al Dr. Daniel Segura y Maria Soledad Moreno del grupo Espin, por su incondicional colaboración en los análisis de biología molecular.

Al Dr. Leobardo Serrano-Carreón por sus valiosos comentarios para este proyecto.

A María Soledad Córdova por su constante apoyo.

En especial a Celia Flores por apoyarme siempre y por los gratos momentos compartidos.

A los compañeros del grupo Galindo: Alicia, Itzma, Lupita, Yuri, Rocío y en especial a Eliane, Daniela y José Luis por todos los momentos que compartimos.

A todos los integrantes del grupo OTR, en especial a Yimy, por ayudarme siempre y compartir conmigo gratos momentos.

A los “alginatos” con quienes compartí estos años: Lorena, Ivette, Miguel, Modesto, Diana, David, muchas gracias por toda su ayuda.

A todos les agradezco enormemente!!!.

**Índice general**

	Página
<b>Resumen</b>	1
<b>Abstract</b>	3
<b>1. Introducción</b>	5
<b>2. Antecedentes</b>	7
2.1. Estructura, propiedades y fuentes de producción de alginatos	7
2.2. Características de las especies de <i>Azotobacter</i>	9
2.3. Metabolismo de fuentes de carbono y energía en <i>A. vinelandii</i>	10
2.4. Biosíntesis y regulación de alginatos bacterianos	12
2.5. Parámetros de cultivo que afectan la producción y composición de alginatos bacterianos	17
2.6. Escalamiento de la producción de alginato	22
2.7. Transferencia de oxígeno en cultivos sumergidos	24
<b>3. Justificación del proyecto</b>	28
<b>4. Hipótesis y objetivos</b>	29
<b>5. Materiales y métodos</b>	31
5.1. Microorganismo y mantenimiento de la cepa	31
5.2. Medio de cultivo	31
5.3. Preparación del inóculo	32
5.4. Descripción del biorreactor y las condiciones de operación	32
5.5. Determinación de la concentración de biomasa	35
5.6. Cuantificación del alginato	35
5.7. Determinación de la concentración de sacarosa	35
5.8. Determinación de la concentración de amonio por el método fenol-hipoclorito	36

5.9. Determinación de PHB por HPLC-UV	36
5.10. Determinación de acetato por HPLC	37
5.11. Determinación del peso molecular promedio del alginato	37
5.12. Determinación de la viscosidad del caldo de cultivo	38
5.13. Microscopía electrónica	38
5.14. Recuperación, purificación de RNA y análisis por PCR en tiempo real (PCR-TR)	39
5.15. Implementación del sistema de análisis de oxígeno en fase gas y estimación de la velocidad de transferencia de oxígeno	41
5.16. Estimación de la máxima velocidad de consumo de oxígeno	45
5.17. Cálculo de la velocidad específica de consumo de oxígeno	45
5.18. Cálculo de la velocidad específica de crecimiento	46
5.19. Estrategia experimental	47
<b>6. Resultados y discusión</b>	<b>48</b>
6.1. Influencia de la velocidad de agitación sobre el crecimiento celular, el consumo de sustratos y la velocidad de transferencia de oxígeno	48
6.2. Análisis del proceso comparando la velocidad de consumo de oxígeno y de transferencia de oxígeno	64
6.3. Utilización de la medición en línea de la velocidad de transferencia de oxígeno para evaluar la existencia de crecimiento diáuxico	66
6.4. Influencia de la velocidad de transferencia de oxígeno sobre la producción de alginato y poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB)	68
6.5. Influencia de la velocidad de transferencia de oxígeno sobre el peso molecular del alginato	81
6.6. Expresión de <i>algL</i> y <i>alg8</i> en cultivos realizados a diferentes velocidades de transferencia de oxígeno	90
6.7. Relación concentración-peso molecular del alginato	93
6.8. Planteamiento final	94

<b>7. Conclusiones</b>	95
<b>8. Perspectivas</b>	97
<b>9. Bibliografía</b>	99
<b>10. Anexos</b>	110

**Índice de figuras**

	Página
<b>Figura 2.1.</b> Estructura química de los constituyentes del alginato.	8
<b>Figura 2.2.</b> Metabolismo de glucosa por la vía Entner-Doudoroff.	11
<b>Figura 2.3.</b> Vías involucradas en la biosíntesis de alginato bacteriano.	13
<b>Figura 2.4.</b> Modelo propuesto de los genes involucrados en la polimerización, modificación y exportación del alginato bacteriano.	16
<b>Figura 5.1.</b> Esquema del sistema utilizado en el desarrollo de este trabajo.	34
<b>Figura 5.2.</b> Evolución del oxígeno en fase gas desde la salida del biorreactor sin microorganismos.	44
<b>Figura 6.1.</b> Evolución de la concentración de biomasa, tensión de oxígeno disuelto y velocidad de transferencia de oxígeno en cultivos de <i>A. vinelandii</i> realizados a 260 y 340 rpm.	50
<b>Figura 6.2.</b> Evolución de la concentración de biomasa, tensión de oxígeno disuelto y velocidad de transferencia de oxígeno en cultivos de <i>A. vinelandii</i> realizados a 400, 450 y 560 rpm.	51
<b>Figura 6.3.</b> Relación entre la velocidad de agitación y el $k_La$ calculado a partir de la medición de la máxima velocidad de transferencia de oxígeno.	58
<b>Figura 6.4.</b> Cinética de consumo de sacarosa y amonio en cultivos de <i>A. vinelandii</i> realizados a 260 y 340 rpm.	60

<b>Figura 6.5.</b> Cinética de consumo de sacarosa y amonio en cultivos de <i>A. vinelandii</i> realizados a 400 y 560 rpm.	61
<b>Figura 6.6.</b> Evolución de la velocidad específica de consumo de oxígeno en cultivos de <i>A. vinelandii</i> realizados a 260, 340, 400, 450 y 560 rpm.	62
<b>Figura 6.7.</b> Cinética de producción de biomasa, consumo de sacarosa y acetato, evolución de la TOD y VTO durante el crecimiento celular en cultivos de <i>A. vinelandii</i> realizados a 340 rpm y 560 rpm.	67
<b>Figura 6.8.</b> Cinética de producción de alginato en cultivos de <i>A. vinelandii</i> realizados a 260, 340, 400 y 560 rpm.	69
<b>Figura 6.9.</b> Influencia de la máxima velocidad de transferencia de oxígeno sobre la concentración de alginato y el contenido de PHB obtenidos durante el crecimiento celular en cultivos de <i>A. vinelandii</i> .	72
<b>Figura 6.10.</b> Influencia de la máxima velocidad de transferencia de oxígeno sobre el rendimiento de sacarosa en alginato y PHB y el rendimiento celular y total de sacarosa en cultivos de <i>A. vinelandii</i> limitados por oxígeno.	78
<b>Figura 6.11.</b> Efecto de la velocidad específica de consumo de oxígeno sobre la concentración de alginato y la velocidad específica de producción de alginato en cultivos de <i>A. vinelandii</i> limitados por oxígeno.	79
<b>Figura 6.12.</b> Evolución del peso molecular promedio del alginato sintetizado en cultivos de <i>A. vinelandii</i> realizados a 260, 340, 400 y 560 rpm.	82
<b>Figura 6.13.</b> Influencia de la máxima velocidad de transferencia de oxígeno sobre el máximo peso molecular promedio (PMP) del alginato obtenido bajo condiciones de limitación de oxígeno en cultivos de <i>A. vinelandii</i> .	85

- Figura 6.14.** Efecto de la velocidad específica de consumo de oxígeno sobre el peso molecular promedio máximo del alginato obtenido bajo condiciones de limitación de oxígeno en cultivos de *A. vinelandii*. 87
- Figura 6.15.** Efecto de la máxima velocidad de transferencia de oxígeno sobre la velocidad específica de crecimiento ( $\square$ ) en cultivos de *A. vinelandii*. 88
- Figura 6.16.** Influencia de la máxima velocidad de transferencia de oxígeno sobre la expresión de los genes *algL* y *alg8* en cultivos de *A. vinelandii* realizados a diferentes velocidades de transferencia de oxígeno. 91

**Índice de tablas**

	Página
<b>Tabla 2.1.</b> Contenido de ácido gulurónico y manurónico en células vegetativas y fracciones de quiste en <i>A. vinelandii</i> .	10
<b>Tabla 5.1.</b> Composición del medio de cultivo utilizado en este trabajo.	31
<b>Tabla 6.1.</b> Valores de los parámetros $Y_{x/o}$ y $m_{o_2}$ obtenidos por ajuste de mínimos cuadrados.	54
<b>Tabla 6.2.</b> Máxima velocidad de consumo de oxígeno calculada y velocidad de transferencia de oxígeno determinadas a diferentes velocidades de agitación.	55
<b>Tabla 6.3.</b> Número de Damköhler ( $Da$ ) calculado en cultivos de <i>A. vinelandii</i> realizados a diferentes velocidades de agitación.	65

## Índice de imágenes

Página

**Fotografía 6.1.** Microfotografías electrónicas de células de *A. vinelandii* con diferente contenido de PHB.

76

## Resumen

El oxígeno disuelto en los cultivos de *Azotobacter vinelandii* tiene un papel importante en la producción de alginato. Cuando no existe un control de la tensión de oxígeno disuelto (TOD), los cultivos de *A. vinelandii* presentan limitación de oxígeno, lo cual tiene efectos importantes en el metabolismo microbiano, afectando la síntesis de alginato.

El objetivo principal de este trabajo consistió en entender la influencia que tiene la limitación de oxígeno principalmente sobre el peso molecular del alginato sintetizado por *A. vinelandii*. Se utilizó una cepa silvestre (ATCC 9046), se realizaron cultivos en un biorreactor de 3.0 L con 2.0 L de volumen de operación, sin control de la TOD y se evaluó la influencia de la limitación de oxígeno utilizando como parámetro la velocidad de transferencia de oxígeno (VTO). La VTO se manipuló por cambios en la velocidad de agitación del biorreactor, en un rango entre 260 y 560 rpm. Los resultados de este trabajo indicaron que durante la etapa de crecimiento del microorganismo, una disminución en la velocidad de transferencia de oxígeno determinó una menor producción del polímero y la síntesis de alginatos de mayor peso molecular. Mientras la bacteria creció, la TOD fue cercana a cero, se alcanzó la máxima velocidad de transferencia de oxígeno y los cultivos estuvieron limitados por oxígeno. Así, la velocidad de transferencia de oxígeno correspondió a la velocidad de consumo de oxígeno (respiración bacteriana), por lo cual es la primera vez que se establece una relación entre la velocidad de respiración celular y la polimerización-depolimerización (pasos implicados en la determinación del peso molecular) del alginato.

Una mayor VTO ( $9.0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) determinó un incremento en la concentración de alginato ( $1.5 \text{ g L}^{-1}$ ) en comparación con los cultivos realizados a más baja VTO ( $3.0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ), en los cuales se obtuvieron  $0.5 \text{ g L}^{-1}$  de alginato. Esta disminución en la producción de alginato, a bajas velocidades de transferencia de oxígeno, se correlacionó con un incremento en la síntesis de PHB. La concentración de este polímero se incrementó desde 17 a 63 % peso seco cuando se disminuyó la VTO desde 9.0 hasta  $3.0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Las evidencias demostraron que la distribución de carbono para la síntesis de alginato y PHB fue controlada por la velocidad de transferencia de oxígeno del cultivo.

En relación con el peso molecular del polímero, en el periodo de crecimiento celular, se obtuvieron alginatos con pesos moleculares cercanos a 1560 kDa cuando la VTO fue de  $3.0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  y de 220 kDa al incrementarse la VTO hasta  $9.0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Una relación similar se obtuvo entre la velocidad específica de consumo de oxígeno y el peso molecular del alginato. Desde una perspectiva tecnológica y con fines industriales específicos (por ej. en la industria farmacéutica), la posibilidad de sintetizar alginatos de más alto peso molecular manipulando la velocidad de transferencia de oxígeno, puede ser de gran utilidad sobre todo en cultivos a una mayor escala.

Utilizando PCR en tiempo real, por primera vez, fue posible determinar la influencia de la VTO sobre la expresión de los genes *alg8* y *algL*. Los resultados demostraron que la expresión de ambos genes tiene una estrecha relación con la velocidad de transferencia de oxígeno del cultivo. Es así como más altas velocidades de transferencia de oxígeno determinaron un aumento en la expresión de *algL*, lo cual podría explicar la sensible disminución del peso molecular del alginato (desde 1560 a 220 kDa) observada a VTO mayores.

En conclusión, los resultados indican que en cultivos bajo condiciones de limitación de oxígeno, la velocidad de transferencia de oxígeno tiene efectos sobre la concentración de alginato, el peso molecular del polímero y la expresión de los genes *alg8* y *algL*. La influencia de la velocidad de transferencia de oxígeno sobre el peso molecular del alginato podría ser explicada debido a un incremento en la expresión de *algL*, gen que codifica la enzima alginato liasa, la cual se sabe provoca una disminución en el peso molecular del alginato.

## Abstract

The dissolved oxygen is of critical importance for alginate production by *Azotobacter vinelandii*. The biosynthesis of the polymer is influenced when the culture is realized with or without dissolved oxygen control. When the cultures of *A. vinelandii* are carried out without dissolved oxygen control, oxygen limitation could take place, which has important effects on cellular metabolism and the alginate production.

The main objective of this work was to understand the influence of oxygen limitation on alginate molecular mass synthesized by *A. vinelandii*. A wild type strain (ATCC 9046) was used; cultures in bioreactor of 3.0 L (working volume of 2.0 L) without dissolved oxygen tension (DOT) were realized. The influence of oxygen limitation was evaluated using as parameter the oxygen transfer rate (OTR). In order to study the influence of the oxygen transfer rate, the OTR was manipulating changing the agitation rate of the bioreactor, between 260 and 560 rpm. The results indicated that during cell growth phase, an increase in alginate concentration was obtained when the OTR was higher, whereas a monotonic increase in molecular mass of the polymer was obtained when OTR was lower. During the cell growth phase, the DOT was nearly zero, the maximum OTR was obtained and the cultures were oxygen-limited. In this condition, the oxygen transfer rate was equals at oxygen uptake rate (bacterial respiration). These findings show for the first time a link between bacterial respiration and the molecular mass of the alginate synthesized by *A. vinelandii*.

A higher OTR ( $9.0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) determined an increase in alginate concentration ( $1.5 \text{ g L}^{-1}$ ) as compared with the cultures developed at lower OTR ( $3.0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ), which  $0.5 \text{ g L}^{-1}$  of alginate was obtained. The decrease of the alginate concentration at lower OTR was linked to an increase in intracellular PHB. The PHB concentration reached 63 % (w/w) when the OTR was  $3.0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , whereas in cultures at  $9.0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , the intracellular PHB production was only 17 % (w/w). The evidences indicate that the distribution of carbon between alginate and PHB was affected by the OTR.

During the cell growth phase, alginates with molecular mass of 1,560 kDa were obtained when the OTR was  $3.0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , whereas at OTR of  $9.0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , the molecular mass of the alginate was 220 kDa. These results show that alginates with a higher molecular mass (1,560 kDa as compared to 220 kDa) were synthesized by lowering the maximum OTR. A similar relationship was obtained between the specific oxygen uptake rate and the molecular mass of the alginate. From a technological perspective and for specific applications (for example, pharmaceutical applications), the findings of this work will allow the development of processes able to produce alginates of specific molecular mass by manipulating the OTR

Using real time PCR, this is the first time that was possible to study the influence of the OTR on expression of the genes *alg8* and *algL*. The results demonstrated that the expression of both genes was linked with OTR. In cultures carried out at higher OTR, an increase in the expression of the *algL* was obtained, which could explain the drop of the alginate molecular mass (from 1,560 at 220 kDa) observed in the cultures conducted at higher OTR.

Overall, these results indicate that in cultures under oxygen limitations conditions, the OTR influences the concentration of alginate, the molecular mass of the polymer and the expression of the genes *alg8* y *algL*. The influence of the oxygen transfer rate on the molecular mass of alginate could be explained due to an increase of the expression of *algL*, gene that encode alginate lyase, which is known that cause the drop in the molecular mass of the alginate.

## 1. Introducción

Los alginatos son polisacáridos compuestos de ácido  $\beta$ -D-manurónico y su epímero el ácido  $\alpha$ -L-gulurónico, los cuales se ordenan en bloques irregulares de manera lineal. Se extraen de diferentes algas pero también pueden ser producidos por la bacteria *Azotobacter vinelandii*. La principal aplicación industrial de los alginatos es como estabilizante, agente gelificante y emulsificante en industrias de alimentos, textiles y farmacéuticas. Desde los años 70 se ha estudiado la síntesis de alginatos por *A. vinelandii* en cultivos por lotes, continuos (Jarman et al. 1978; Horan et al. 1983; Peña et al. 1997; Clementi et al. 1999; Sabra et al. 2000; Trujillo-Roldán et al. 2004) y recientemente en cultivos por lote alimentado (Priego-Jiménez et al. 2005). Se sabe que la concentración de oxígeno disuelto tiene un importante efecto en la síntesis de alginato y en el crecimiento de *A. vinelandii*. A una baja tensión de oxígeno disuelto (TOD), la bacteria acumula intracelularmente poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB) y a una alta TOD, *A. vinelandii* usa la fuente de carbono principalmente para la producción de biomasa. Otro aspecto que recientemente se ha estudiado es el efecto que tiene la velocidad específica de crecimiento sobre la producción de alginato. En cultivos por lotes de *A. vinelandii*, manipulando la potencia volumétrica suministrada (P/V), Reyes et al. (2003) demostró que al disminuir la velocidad específica de crecimiento se sintetizan alginatos de mayor peso molecular. Un comportamiento similar fue reportado en cultivos por lote alimentado de *A. vinelandii* limitados por la fuente de carbono (Priego-Jiménez et al. 2005). Estas evidencias indican que la velocidad específica de crecimiento, independiente de cómo sea manipulada, determina el peso molecular del alginato sintetizado por *A. vinelandii*.

La mayoría de los estudios relacionados con la producción de alginato por *A. vinelandii* se han realizado bajo condiciones controladas de la TOD (Sabra et al. 2000; Peña et al. 2000; Trujillo-Roldán et al. 2004). En la literatura existen sólo dos trabajos en los que se estudió la producción de alginato por *A. vinelandii* en cultivos sin control de la tensión de oxígeno disuelto (Parente et al. 1998; Reyes et al. 2003) y aunque en estos estudios, la tensión de oxígeno disuelto fue cercana a cero durante el crecimiento celular, no se evaluó la posible influencia de condiciones de limitación de oxígeno sobre el crecimiento del microorganismo y la producción de alginato. Considerando además, que el metabolismo celular cambia considerablemente si existe o no limitación de oxígeno en el cultivo (Varma et al. 1993; Khatri y Hoffmann 2006), en este trabajo se estudió la producción de alginato por *A. vinelandii* bajo condiciones de limitación de oxígeno en un biorreactor de 3.0 L.

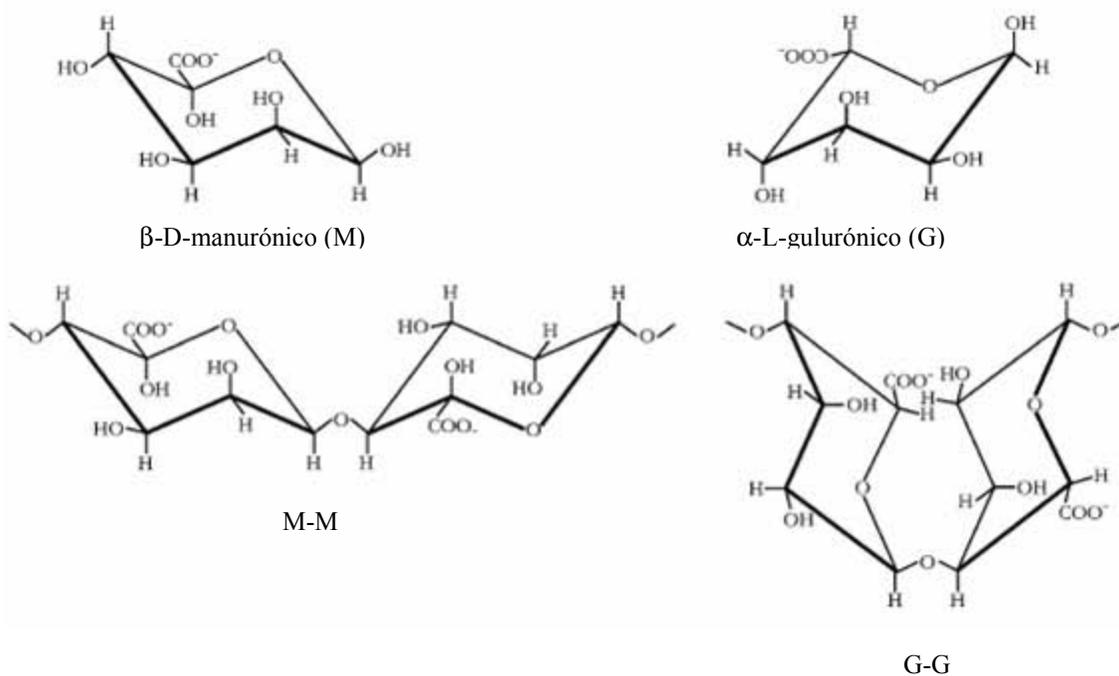
Es sabido que en cultivos aerobios, la medición de la velocidad de transferencia de oxígeno (VTO) es un excelente indicador de las diferentes respuestas fisiológicas que presentan los cultivos (Anderlei y Büchs 2001). Por esto, en el presente estudio se implementó en línea el análisis de oxígeno en la fase gas (a la salida del biorreactor), lo cual permitió estimar la velocidad de transferencia de oxígeno durante el transcurso del cultivo. Para manipular la VTO del cultivo se realizaron cultivos de *A. vinelandii* a diferentes velocidades de agitación (entre 260 y 560 rpm) y se determinó la influencia de la velocidad de transferencia de oxígeno sobre la concentración de alginato y su peso molecular durante el periodo de limitación de oxígeno.

## 2. Antecedentes

### 2.1. Estructura, propiedades y fuentes de producción de alginatos

Los alginatos pertenecen a una familia de biopolímeros de importancia biotecnológica y de interés científico. Son polisacáridos que están constituidos por los ácidos urónicos; ácido  $\beta$ -D-manurónico (M) y su epímero ácido  $\alpha$ -L-gulurónico (G), los cuales se ordenan en bloques irregulares de manera lineal. En la figura 2.1 se muestra la estructura química de ambos ácidos urónicos. Se utilizan como agentes espesantes, gelificantes y estabilizantes de espumas y emulsiones, en la microencapsulación de células y preparación de biocatalizadores, así como material de implantación y encapsulación, siendo usados para una variedad de aplicaciones en industrias de alimentos y farmacéuticas (Rehm y Valla 1997; Gacesa 1998; Sabra et al. 2001; Remminghorst y Rehm 2006a). En la actualidad, los alginatos son extraídos de algas marinas, tales como *Laminaria* y *Macrocistis*. Los alginatos extraídos de algas son relativamente baratos, teniendo precios que oscilan entre US\$ 5-20/Kg, en cambio, los alginatos de mayor pureza para ser usados en la industria farmacéutica pueden llegar a costar US\$ 40,000/Kg (Rehm y Valla 1997). Los alginatos algales tienen un limitado uso en la industria farmacéutica, ya que en este rubro se requiere un polímero con características definidas y específicas. Esto, porque los alginatos algales son una compleja mezcla que presentan un amplio rango de pesos moleculares y composición G-M; siendo éstas características de composición imposible de controlar durante la cosecha de las algas. Por este motivo, ha sido estudiada la producción de alginatos por bacterias, bajo condiciones controladas de cultivo. Los alginatos pueden ser producidos por bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Azotobacter*. Los alginatos bacterianos se diferencian de los algales porque se encuentran acetilados en algunos residuos de ácido manurónico (Davidson et al. 1977;

Peña et al. 2006) y además porque usualmente son de más alto peso molecular (5 a 10 veces) que el polímero obtenido de algas, que sólo alcanza pesos moleculares entre 48 y 186 kDa (Rehm y Valla 1997). Una característica importante de las soluciones que contienen alginato, es que éstas tienen altas viscosidades, lo cual es atractivo desde una perspectiva de aplicación tecnológica. Es sabido que la acetilación, la proporción de residuos G-M, el peso molecular y la concentración del polímero tienen influencia directa sobre la viscosidad y las propiedades reológicas de las soluciones de alginato (Geddie y Sutherland 1994).



**Figura 2.1.** Estructura química de los constituyentes del alginato.

## 2.2. Características de las especies de *Azotobacter*

*Azotobacter vinelandii* pertenece a la familia de las bacterias Azotobacteriaceae y es una bacteria aerobia estricta, capaz de fijar nitrógeno, ya que posee un complejo enzimático con actividad nitrogenasa, el cual es altamente sensible a oxígeno (Kuhla y Oelze 1988). Este microorganismo produce dos polímeros de interés industrial: el polisacárido alginato y el poliéster intracelular poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB). El PHB es un termoplástico biodegradable usado como sustituto de plásticos y es acumulado intracelularmente como una fuente de carbono y energía durante el crecimiento desbalanceado de la bacteria (Senior y Dawes 1973).

*A. vinelandii* presenta una morfología variada, que va desde bacilos hasta células en forma de cocos, con diámetros entre 1.5 a 2  $\mu\text{m}$  y se mueven por flagelos peritricos. El género *Azotobacter* tiene la característica de formar quistes resistentes a la desecación (Sadoff 1975), los cuales son estados celulares que presentan una notable disminución de la actividad metabólica. El proceso de enquistamiento puede ser inducido por  $\beta$ -hidroxibutirato (Lin y Sadoff 1968) y los alginatos son esenciales durante el proceso de enquistamiento. Durante la inducción del enquistamiento, las células vegetativas pierden su motilidad, se tornan esféricas y su pared celular se engruesa, desarrollándose el quiste. Este proceso genera células en reposo con un cuerpo central, rodeado por una cápsula formada por dos capas: una interna (intina) y otra externa (exina) de lipoproteína-lipopolisacárido, constituida entre otros compuestos por ácidos urónicos (Sadoff 1975). En la tabla 2.1 se muestra el contenido de ácidos urónicos en células vegetativas y fracciones de quistes en *A. vinelandii*.

**Tabla 2.1.** Contenido de ácido gulurónico (G) y manurónico (M) en células vegetativas y fracciones de quiste en *A. vinelandii* (Sadoff 1975).

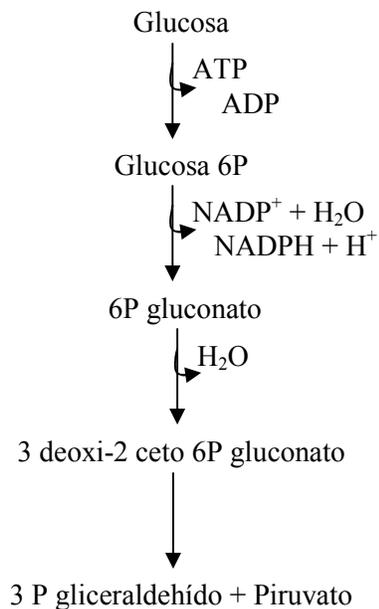
<b>MATERIAL CELULAR</b>	<b>PORCENTAJE TOTAL DE ÁCIDO URÓNICO</b>			
	<b>Razón M/G</b>	<b>M-G</b>	<b>M-M</b>	<b>G-G</b>
<b>Célula vegetativa</b>	1.84	62.6	33.5	3.9
<b>Quiste Exina</b>	0.45	52.8	4.6	42.6
<b>Quiste Intina</b>	1.81	51.3	38.8	9.1

M-M polimanuronato, G-G poliguluronato

Como se puede observar en la tabla 2.1, la exina es rica en ácido poligulurónico (42.6 %) y la intina contiene altos niveles de polimanurónico (38.8 %). La presencia de estos ácidos urónicos (G-M, constituyentes del alginato) en la exina e intina, indica que el alginato tiene un rol durante el proceso de enquistamiento.

### 2.3. Metabolismo de fuentes de carbono y energía en *A. vinelandii*

Desde hace algunos años se ha establecido que el catabolismo de glucosa en células de *A. vinelandii* ocurre principalmente por la vía Entner-Doudoroff (Still y Wang 1964) y más recientemente estudios con resonancia magnética nuclear han confirmado esta evidencia (Beale y Foster 1996). La vía Entner-Doudoroff es común en muchas bacterias y es la principal ruta de oxidación de la glucosa, la cual es transformada en piruvato y 3P gliceraldehído. En la figura 2.2 se muestra la vía del metabolismo de glucosa en *A. vinelandii*.



**Figura 2.2.** Metabolismo de glucosa por la vía Entner-Doudoroff.

Es sabido que *A. vinelandii* puede metabolizar diferentes fuentes de carbono, entre las cuales se encuentran sacarosa, galactosa, sorbitol, acetato e intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Horan et al. 1981; George et al. 1985; Wong y Yao 1995). Asimismo, especies de *A. vinelandii* pueden crecer y fijar nitrógeno atmosférico en un medio con ácido hidroxibenzoico como única fuente de carbono (Vargas-García et al. 2001). En algunos trabajos se ha estudiado la actividad de enzimas involucradas en el metabolismo de la glucosa. Se ha establecido que un incremento en la actividad de la enzima aldolasa, se relaciona con una disminución en el rendimiento celular (Nagai et al. 1971), lo cual puede ser explicado por una disminución en el flujo de carbono hacia el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, debido a una transformación (por acción de la aldolasa) de dos moléculas de 3P gliceraldehído en fructosa 1,6 difosfato.

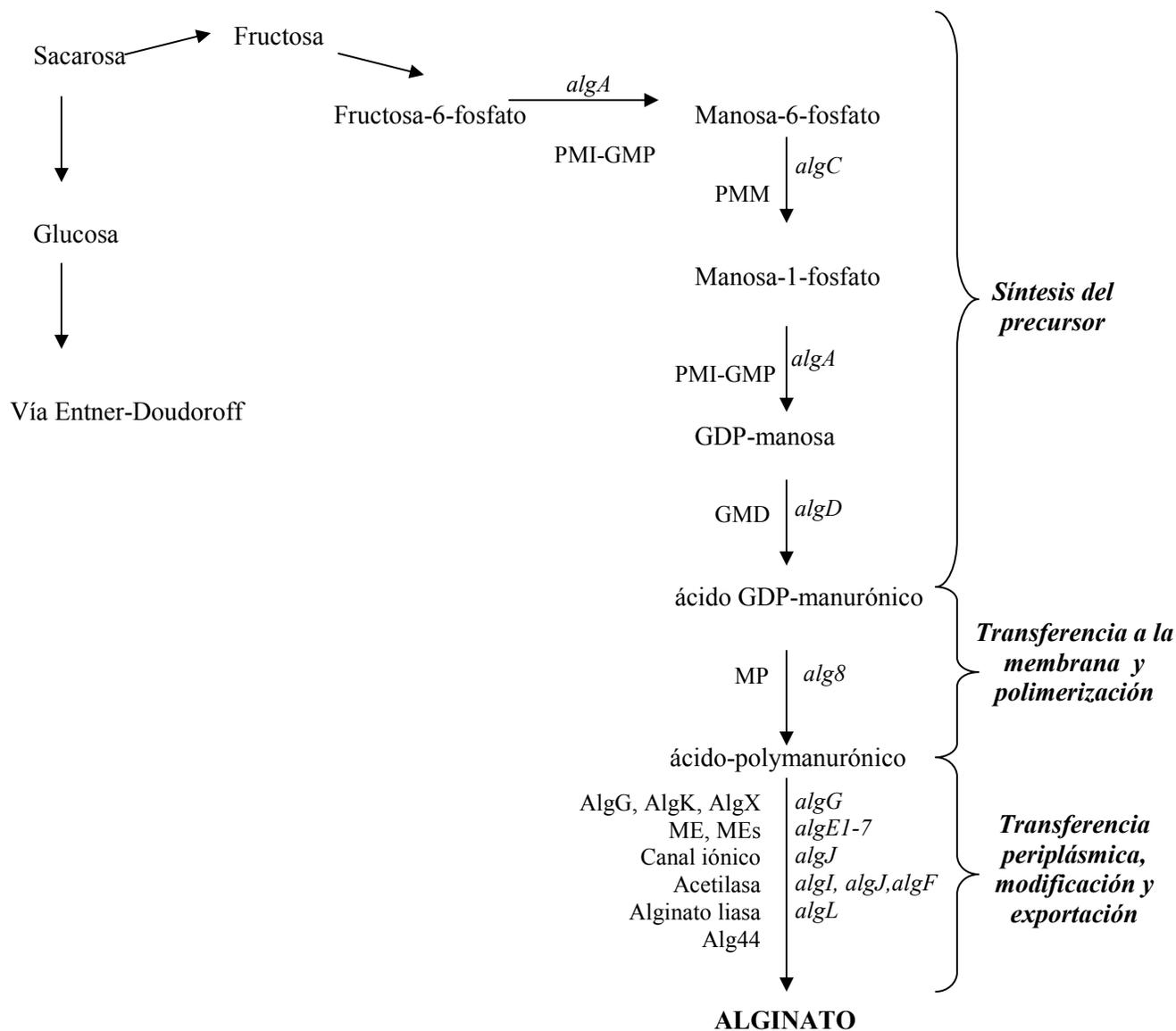
## 2.4. Biosíntesis y regulación de alginatos bacterianos

La biosíntesis de alginatos bacterianos (figura 2.3) es similar en especies de *Azotobacter* y *Pseudomonas* y ha sido descrita recientemente en algunas revisiones (Remminghorst y Rehm 2006a; Galindo et al. 2007). La síntesis de este polisacárido puede ser dividida en cuatro etapas diferentes: (1) síntesis del precursor (ácido GDP-manurónico), (2) transferencia a la membrana citoplasmática y polimerización (aumento del peso molecular), (3) transferencia periplásmica y modificación y (4) exportación a través de la membrana externa.

### *Síntesis del precursor*

Se han estudiado con detalle las etapas involucradas en síntesis del precursor de alginato, el ácido GDP-manurónico. La síntesis de dicho precursor ocurre en el citoplasma y su formación a partir de sacarosa, glucosa o fructosa ha sido estudiada en *Azotobacter vinelandii* y en *Pseudomonas aeruginosa* (Pindar y Bucke 1975).

Diferentes genes están involucrados en la síntesis del polímero. De acuerdo a los altos niveles intracelulares de GDP-manosa y su utilización en diferentes vías, se ha establecido que la etapa limitante de la biosíntesis de alginato es la mediada por *algD* (Tatnell et al. 1994), el cual codifica para la enzima GDP-manosa deshidrogenada, responsable de controlar la reacción irreversible a ácido-GDP-manurónico (figura 2.3).



**Figura 2.3.** Vías involucradas en la biosíntesis de alginato bacteriano (adaptado de Galindo et al. 2007). Los nombres de las enzimas se abrevian en letra mayúscula por sus siglas en inglés y los genes de cada etapa se indican en letra cursiva. PMI, fosfomasosa isomerasa; GMP, guanosina difosfomanosa pyrofosforilasa; PMM, fosfomanomutasa; GMD, GDP-manosa deshidrogenasa; MP, manurotano polimerasa; ME, manuronato epimerasa AlgG (*Pseudomonas*); MEs, manuronato epimerasa AlgE1 a 7 (*Azotobacter*).

### ***Transferencia a la membrana citoplasmática y polimerización***

La segunda etapa en la biosíntesis de alginato consiste en la transferencia del precursor citoplasmático (ácido GDP-manurónico) a través de la membrana citoplasmática y la polimerización de los monómeros para formar polimarunorato. En *A. vinelandii* el proceso de polimerización de alginato es más desconocido que en *P. aeruginosa*. El complejo polimerasa de la biosíntesis de alginato no ha sido totalmente purificado, por lo que sólo se tienen algunos posibles candidatos responsables de la polimerización del alginato. La mayoría de los trabajos relacionados con la función y rol de las diferentes unidades responsables de la polimerización del alginato (genes *alg8*, *alg44*, *algK*, *algX*) se han realizado en *P. aeruginosa* (Remminghorst y Rehm 2006a). En algunos estudios de *A. vinelandii*, se ha reportado que los genes *alg8* y *alg44* son esenciales para la síntesis de alginato (Mejía-Ruiz et al. 1997). Se ha establecido que la biosíntesis de alginato es controlada a nivel citoplasmático por la actividad de la enzima GDP-manosa deshidrogenasa (Tatnell et al. 1994). Recientemente, se ha demostrado en *P. aeruginosa* que la introducción de copias extras del gen *alg8* incrementa en al menos diez veces la producción de alginato y por lo tanto, se postula que el producto de *alg8*, el complejo de polimerización, podría ser otra etapa limitante de la producción de alginato (Remminghorst y Rehm 2006b).

### ***Transferencia periplásmica y modificación***

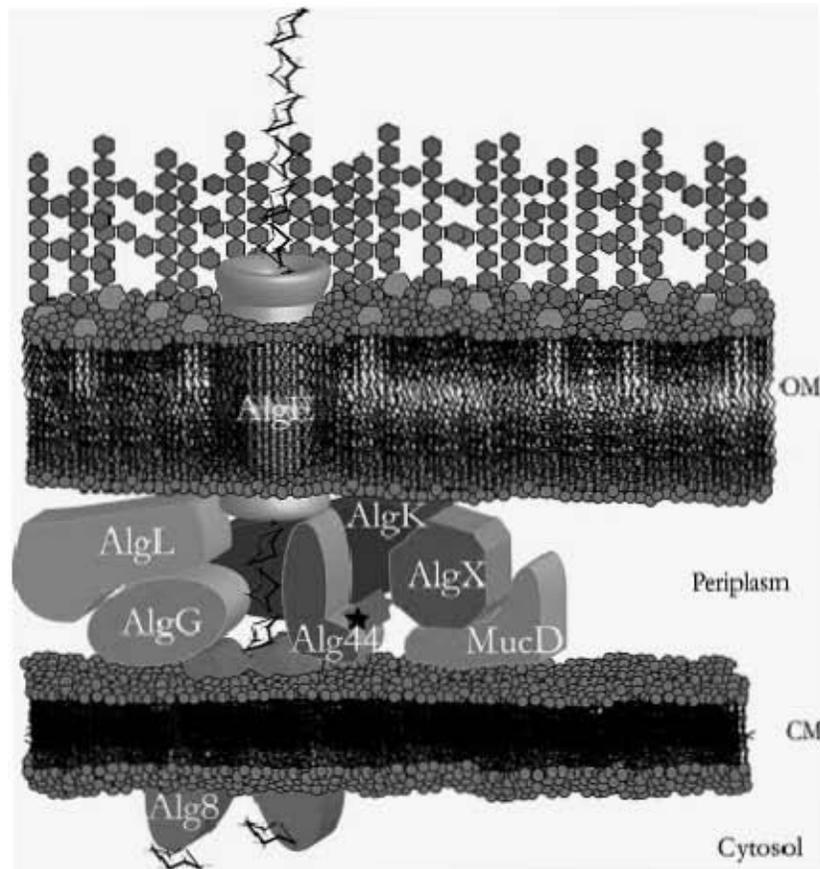
La transferencia y modificación del alginato es una de las etapas más desconocidas en la síntesis de alginato por *A. vinelandii*. Se sabe que la modificación de alginatos bacterianos ocurre casi completamente en el periplasma, lo cual implica que el alginato es sintetizado como polimarunorato y su modificación se realiza a nivel del polímero. A nivel periplásmico, las

principales modificaciones del alginato son la acetilación (genes involucrados *algI*, *algJ*, *algF*) y el control del tamaño molecular por la acción de alginato liasas, codificadas por *algL* (Wong et al. 2000). La acetilación ocurre en los grupos hidroxilos, en las posiciones C2 y/o C3 de los residuos de ácido manurónico, lo cual impide la epimerización de esos residuos y su degradación por alginato liasas. Así, la acetilación periplásmica indirectamente controla la epimerización y la degradación del alginato bacteriano.

Las alginato liasas (o alginasas) catalizan la degradación del alginato. En los alginatos producidos por bacterias, las alginato-liasas funcionan como enzimas de edición que controlan la longitud y peso molecular del polímero (Kennedy et al. 1992). Recientemente, Albrecht y Schiller (2005) demostraron que en *P. aeruginosa*, en ausencia de actividad alginato liasa se producen bajos niveles de ácidos urónicos (manurónico y gulurónico), por lo que la actividad liasa es crítica para la biosíntesis de alginato. En *A. vinelandii*, los estudios en este sentido son escasos y sólo sugieren que el rol de la alginato liasa, presente en la cepa tipo silvestre (ATCC 9046), se encuentra limitado a etapas post-polimerización (Trujillo-Roldán et al. 2004). En esta etapa, la alginato liasa es responsable de depolimerizar el alginato (disminuir su peso molecular) una vez que ya ha sido sintetizado.

*Pseudomonas* y *Azotobacter* difieren con respecto a la epimerización del alginato, ya que *Pseudomonas* posee sólo una epimerasa periplásmica (codificada por el gen *algG*) y en cambio el genoma de *A. vinelandii* codifica una familia de siete epimerasas extracelulares (genes *algE1-7*) (Ertesvåg et al. 1995) que transforman unidades de manurónico en gulurónico a nivel del polímero.

En la figura 2.4 se muestra el modelo propuesto por Remminghorst y Rehm (2006a) del complejo enzimático de polimerización, modificación y exportación del alginato bacteriano.



**Figura 2.4.** Modelo propuesto de los genes involucrados en la polimerización, modificación y exportación del alginato bacteriano (Remminghorst y Rehm 2006a).

Desde un punto de vista de producción del alginato, el control del nivel de acetilación, epimerización y peso molecular abren un nuevo campo de aplicación biotecnológica de los alginatos bacterianos. En este sentido, Ertesvåg et al. (1999) han demostrado que es posible utilizar dos de

las enzimas responsables de la epimerización en *A. vinelandii* (algE1 y algE3) para producir alginatos con propiedades específicas para determinados usos biotecnológicos.

### ***Exportación a través de la membrana externa***

En *Pseudomonas*, la exportación del alginato es a través de una proteína de membrana externa codificada por *algE*. La proteína codificada por *algJ* en *A. vinelandii* es altamente similar con *algE* y tiene la misma función que en *Pseudomonas* (Remminghorst y Rehm 2006a).

## **2.5. Parámetros de cultivo que afectan la producción y composición de alginatos bacterianos**

Desde la década de los 70 se ha estudiado la síntesis de alginatos por *A. vinelandii*, tanto en cultivos por lotes (Clementi et al. 1995; Peña et al. 1997; Clementi et al. 1999; Sabra et al. 1999; Parente et al. 2000; Peña et al. 2000; Trujillo-Roldán et al. 2004) en sistemas continuos (Jarman et al. 1978; Horan et al. 1983; Sabra et al. 2000) y más recientemente en cultivos por lotes alimentado (Priego-Jiménez et al. 2005). Asimismo, se ha estudiado la producción de alginato en cultivos de *A. vinelandii* utilizando reactores de membrana (Saude et al. 2002) y usando células inmovilizadas (Saude y Junter 2002). Recientemente, algunas revisiones han destacado la necesidad de implementar nuevas estrategias de bioingeniería y de biología molecular para la obtención de alginatos de mejor calidad (Remminghorst y Rehm 2006a; Galindo et al. 2007). Todos los estudios han reconocido que la producción de alginato y su peso molecular se afectan considerablemente por los componentes del medio de cultivo, la velocidad específica de crecimiento, la tensión de oxígeno disuelto y el mezclado.

### ***Influencia del medio de cultivo***

Es ampliamente sabido que los componentes del medio de cultivo juegan un papel importante en la producción de alginato por *A. vinelandii*. La mayoría de los estudios en este sentido, se han centrado en evaluar la influencia de fosfato o nitrógeno sobre el rendimiento del alginato y el peso molecular del alginato sintetizado (Sabra et al. 1999; Parente et al. 2000). En cultivos en matraces, al comparar cultivos realizados con diferentes fuentes nitrogenadas (orgánicas e inorgánicas) se observó que la presencia de amonio en el medio de cultivo afecta negativamente la síntesis de alginato por *A. vinelandii* (Brivonese y Sutherland 1989).

Sabra et al. (1999) encontraron en cultivos por lotes, que un exceso de fosfato en el medio de cultivo ( $400 \text{ mg L}^{-1}$ ) provocó una disminución del rendimiento específico de alginato ( $0.25 \text{ g alg g biomasa}^{-1}$ ). También se ha demostrado que el nivel de fosfato inicial afecta el contenido de residuos de ácido manurónico en la molécula de alginato. Así, cuando la concentración inicial de fosfato fue menor ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ), el contenido de manuronato en el polímero alcanzó un 90 %, en cambio, si el fosfato inicial fue de  $200 \text{ mg L}^{-1}$  sólo se obtuvo un 75 % de manuronato (Sabra et al. 1999).

En cultivo continuo limitado por calcio, no se observó un incremento en la producción de alginato; sin embargo, la proporción de residuos G-M fue mayor, lo cual es reflejo de la actividad epimerasa dependiente de calcio (Annison y Couperwhite 1986).

Recientemente, Peña et al. (2006) demostraron en cultivos realizados en matraces, que la adición de MOPS (ácido 3-(N-morfolino)-propano-sulfónico, un amortiguador del pH) al medio

de cultivo, determina el contenido de grupos acetilos del alginato y las propiedades fisicoquímicas del polímero.

El proceso de inoculación también representa un importante factor en la producción de alginato. Utilizando células lavadas para inocular un biorreactor, Trujillo-Roldán et al. (2003b) demostraron que es posible obtener alginatos de más alto peso molecular (1200 kDa) que cuando se cultiva la bacteria con un inóculo convencional (350 kDa). Estas evidencias indican que componentes del inóculo agotado (aún desconocidos) afectan las características del alginato sintetizado.

### ***Influencia de la velocidad específica de crecimiento***

Recientemente, se ha estudiado el efecto de la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) sobre la producción de alginato (Reyes, 2003; Priego-Jiménez et al. 2005). En cultivos por lotes de *A. vinelandii*, manipulando la potencia suministrada (P/V), Reyes (2003) demostró que si la velocidad específica de crecimiento disminuye a  $0.09 \text{ h}^{-1}$  se obtienen alginatos con un peso molecular de 1800 kDa, mientras que a una  $\mu$  de  $0.16 \text{ h}^{-1}$  el peso molecular del alginato fue cercano a 1100 kDa. Estos resultados indican que una disminución de la velocidad de crecimiento (manipulada por cambios en P/V) determina la producción de alginatos de mayor peso molecular. En este mismo sentido, en cultivos por lote alimentado limitado por carbono (TOD = 3 %), Priego-Jiménez et al. (2005) demostraron que una disminución en la velocidad específica de crecimiento ( $\mu < 0.1 \text{ h}^{-1}$ ) favorece la síntesis de alginatos de alto peso molecular (1300 kDa).

Estas evidencias muestran que la velocidad específica de crecimiento tiene efectos en el peso molecular del alginato sintetizado por *A. vinelandii*.

### ***Influencia de la tensión de oxígeno disuelto (TOD) y el mezclado***

En diferentes estudios se ha demostrado que la aireación y el mezclado son parámetros críticos para la optimización de la producción de polisacáridos microbianos. En la literatura existen diferentes reportes acerca del efecto de la TOD sobre la producción de alginatos. En los estudios realizados hasta ahora, la TOD se ha controlado por manipulación de la velocidad de agitación (Parente et al. 1998) o por variación de la proporción de oxígeno o nitrógeno presentes en el gas de entrada (Peña et al. 2000; Sabra et al. 2000; Trujillo-Roldán et al. 2004).

En cultivos de *A. vinelandii* realizados a una baja tensión de oxígeno disuelto (< 1 %), se favorece la acumulación intracelular de PHB (Horan et al. 1983) y en cambio a una TOD más alta (cercana al 10 %), el microorganismo utiliza la fuente de carbono principalmente para la producción de biomasa.

Estudios en cultivos bajo condiciones de fijación de nitrógeno (Sabra et al. 2000) y en cultivos que previenen la fijación de nitrógeno (Parente et al. 2000; Peña et al. 2000; Trujillo-Roldán et al. 2004) muestran que el peso molecular del alginato es fuertemente influenciado por la TOD y la velocidad de agitación. A velocidades de agitación de 300 rpm y a una TOD de 5 %, *A. vinelandii* produce un alginato de alto peso molecular (680 kDa) y a una velocidad de agitación más alta (700 rpm) e independiente de la TOD utilizada (entre 0.5 y 5 %), se obtienen alginatos de menor peso molecular (352 kDa) (Peña et al. 2000). Asimismo, a una

TOD de 5 %, la bacteria produce más alginato ( $4.5 \text{ g L}^{-1}$ ) que cuando la TOD es más baja (0.5 %), el cual alcanzó  $1.0 \text{ g L}^{-1}$  en los cultivos a 300 rpm.

En este mismo sentido, Trujillo-Roldán et al. (2004) demostraron que el peso molecular promedio (PMP) del alginato está fuertemente influenciado por la TOD. El peso molecular promedio del alginato se incrementó hasta alcanzar un valor máximo (985 kDa) cuando la TOD aumentó desde 1 a 3 % y disminuyó a 400 kDa cuando la TOD fue más alta (5 %). Estos autores postularon que el complejo polimerasa es influenciado por la TOD, desconociéndose hasta ahora el mecanismo celular involucrado. Asimismo, utilizando una cepa modificada (alginato liasa menos), estos autores demostraron que la actividad alginato liasa no es esencial para la producción de alginato y que cuando esta enzima se encuentra presente (como en el caso de la cepa silvestre), su acción es limitada a etapas de post-polimerización.

Desde un punto de vista cinético, existen claras diferencias respecto de la producción de alginato en cultivos con o sin control de la TOD. Sin control de la TOD, la síntesis de alginato se encuentra parcialmente asociada al crecimiento de *A. vinelandii* (Peña et al. 1997; Parente et al. 1998) y en cambio, si la TOD se controla (a 3 %), la síntesis de alginato se encuentra totalmente asociada al crecimiento celular (Peña et al. 2000). Por otra parte, en biorreactores sin control de la TOD se obtiene una mayor heterogeneidad de familias de alginatos que en cultivos con control del oxígeno disuelto (Reyes, 2003). El grado de heterogeneidad de familias de peso molecular de un polímero se determina a través del índice de polidispersión (IP). Mientras menor sea este índice, más moléculas del mismo peso molecular existirán en el caldo. En cultivos con control de la TOD (3 %) se obtienen índices de polidispersión (IP) cercanos a 10 (Peña et al. 2000) y por el contrario, en cultivos sin control de la TOD el IP varía entre 76 y 250, lo cual refleja una mayor

distribución de familias de pesos moleculares de alginato (Reyes, 2003). Estos niveles mayores de polidispersión de alginatos pueden explicarse porque cuando no hay control de la TOD, las células están expuestas a diferentes tensiones de oxígeno: cerca del impulsor a una TOD máxima y detrás de los baffles, por ejemplo, a una TOD muy baja.

En la literatura sólo existen dos reportes en los cuales se ha estudiado la producción de alginato por *A. vinelandii* en condiciones no controladas de TOD (Parente et al. 1998; Reyes et al. 2003). En ambos trabajos la TOD disminuyó a valores cercanos a cero durante la etapa de crecimiento celular y posiblemente existieron condiciones de limitación de oxígeno. Sin embargo, en aquellos trabajos no fue evaluada la existencia e implicaciones de condiciones de limitación de oxígeno. Es sabido que el metabolismo celular tiene diferencias importantes bajo condiciones totalmente aerobias o de limitación de oxígeno. La limitación de oxígeno puede limitar la capacidad respiratoria del sistema y la fuente de carbono puede ser sólo parcialmente oxidada, lo cual conduce a la secreción de subproductos que permiten la generación de energía mientras que el metabolismo redox es balanceado. Aunque la influencia de la limitación de oxígeno ha sido estudiada en diferentes cultivos microbianos (Varma et al. 1993; Charoenrat et al. 2005; Khatri y Hoffmann 2006; Zimmermann et al. 2006), en cultivos de *A. vinelandii* no han sido evaluadas las implicaciones de una condición de limitación de oxígeno sobre la producción de alginato.

## **2.6. Escalamiento de la producción de alginato**

En la literatura sólo existen algunos estudios donde se intenta reproducir la producción de alginato a una escala mayor. Trujillo-Roldán et al. (2001) reportó estudios de escalamiento

descendente, en los cuales condiciones que ocurren en un reactor de mayor volumen se simularon en un reactor a nivel laboratorio. En ese trabajo, cuando *A. vinelandii* se cultivó bajo condiciones de oscilación de la tensión de oxígeno disuelto, se sintetizaron alginatos de menor peso molecular si se compara con los obtenidos a una TOD constante del 3 %. Estas evidencias indican que en cultivos con un deficiente control de la TOD (por ejemplo, causado por una alta viscosidad o insuficiente mezclado), se obtiene una menor calidad del alginato en términos de su peso molecular.

En un intento por reproducir el peso molecular del alginato obtenido en matraces en un biorreactor de 1.0 L (sin control de la TOD ni del pH), Reyes et al. (2003) desarrollaron una estrategia de escalamiento en donde se utilizó como criterio la potencia volumétrica (P/V). A una misma P/V (tanto en matraz como en el reactor), en el biorreactor, el peso molecular fue casi tres veces menor al obtenido en matraces (1900 kDa) y la viscosidad fue cinco veces más baja (100 mPa s) que la obtenida en matraces. Estos autores demostraron que una misma P/V inicial no permite reproducir el comportamiento, principalmente en términos de peso molecular y viscosidad. Sólo una disminución de la P/V durante el desarrollo del cultivo en el biorreactor, permitió obtener alginatos de peso molecular similar a los obtenidos en matraces.

En este mismo sentido, recientemente en nuestro grupo del IBT-UNAM, Millán (2006), en un biorreactor de 14 L desarrolló una estrategia de escalamiento considerando como criterio la potencia volumétrica. Cuando se reproduce el perfil de P/V del matraz en el biorreactor, se obtuvieron alginatos de peso molecular similar en ambos sistemas. Este comportamiento fue atribuido a la existencia de periodos semejantes de limitación de oxígeno en los matraces y en el biorreactor. Sin embargo, un parámetro que no se determinó en los cultivos realizados en

bioreactor fue la velocidad de transferencia de oxígeno, el cual ha sido descrito como un parámetro que permite establecer la existencia de condiciones de limitación de oxígeno en un cultivo (Anderlei y Büchs 2001).

Recientemente, Peña et al. (2007) realizaron un estudio de la evolución de la P/V y la velocidad de transferencia de oxígeno en cultivos de *A. vinelandii* llevados a cabo en matraces, con el fin de tener un mayor entendimiento de la producción de alginato en matraces y así desarrollar mejores estrategias de escalamiento del proceso. Los resultados mostraron que la P/V se incrementó exponencialmente (hasta  $1.4 \text{ kW m}^{-3}$ ) durante el transcurso del cultivo, debido a un aumento en la viscosidad del caldo de cultivo. Asimismo, la velocidad de transferencia de oxígeno mostró un perfil típico de cultivo limitado por oxígeno, caracterizado por una velocidad de transferencia de oxígeno constante durante el crecimiento celular (Anderlei y Büchs 2001).

## 2.7. Transferencia de oxígeno en cultivos sumergidos

El suministro de oxígeno a un reactor es una de las tareas más importantes en cultivos aerobios, ya que la oxidación de la fuente de carbono y su metabolismo en células genera una demanda que es indispensable satisfacer por medio de la aireación y el mezclado. En muchas ocasiones y bajo diferentes condiciones de cultivo, el oxígeno puede llegar a ser el limitante del crecimiento celular.

Un balance de oxígeno para un sistema aerobio, puede ser descrito por la siguiente ecuación:

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = k_L a \cdot (C_{O_2}^* - C_{O_2}) - q_{O_2} \cdot C_X = VTO - VCO \quad (2.1)$$

donde:

$\frac{dC_{O_2}}{dt}$  = cambio de la concentración de oxígeno con respecto al tiempo

$k_L a$  = coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ( $h^{-1}$  ó  $s^{-1}$ )

$C_{O_2}^*$  = solubilidad de oxígeno en la fase líquida (moles  $O_2$   $L^{-1}$ )

$C_{O_2}$  = concentración de oxígeno en la fase líquida (moles  $O_2$   $L^{-1}$ )

$q_{O_2}$  = velocidad específica de consumo de oxígeno (moles  $O_2$   $g^{-1} h^{-1}$ )

$C_X$  = concentración de biomasa ( $g L^{-1}$ )

$VTO = k_L a \cdot (C_{O_2}^* - C_{O_2})$  = velocidad de transferencia de oxígeno ( $mol L^{-1} h^{-1}$ )

$VCO = q_{O_2} \cdot C_X$  = velocidad de consumo de oxígeno ( $mol L^{-1} h^{-1}$ )

Uno de los aspectos más importantes en el desarrollo, escalamiento y economía de los bioprocesos, es sin duda la velocidad de transferencia de oxígeno. Los microorganismos en un cultivo sumergido consumen el oxígeno a una determinada velocidad (VCO) y si la concentración celular es alta o si el microorganismo tiene una alta velocidad específica de consumo de oxígeno, es posible que la VCO exceda la velocidad de transferencia de oxígeno (VTO), por lo cual el cultivo se encuentra limitado por oxígeno. Los cultivos que presentan limitación por oxígeno o fuente de carbono, inhibición por productos y crecimiento diáuxico pueden ser evaluados basándose en la variación de la velocidad de transferencia de oxígeno durante el transcurso del cultivo (Anderlei et al. 2004). Existen algunos reportes en los cuales se ha medido la VTO en el transcurso del cultivo (Amanullah et al. 1998; Chen et al. 1999; Sahoo y Agarwal 2002; Richard y Margaritis 2003; Anderlei et al. 2004; Charoenrat et al. 2006); sin embargo, no existen mediciones de la VTO en cultivos de *A. vinelandii* realizados en biorreactor.

En la literatura existen diversos estudios que revelan la importancia de la velocidad de transferencia de oxígeno y de la velocidad de consumo de oxígeno sobre la producción de polisacáridos microbianos (Herbst et al. 1992; Amanullah et al. 1998; Schilling et al. 1999). Por ejemplo, en cultivos de *Xanthomonas campestris* se ha observado que la productividad de xantana se incrementa de manera lineal con un aumento de la velocidad de específica de consumo de oxígeno (Amanullah et al. 1998).

Una forma de conocer la capacidad y eficiencia de transferencia de oxígeno en un sistema de cultivo es a través de la medición del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ( $k_{L,a}$ ) o de la velocidad de transferencia de oxígeno (VTO). En la mayoría de los casos, se ha utilizado como criterio de escalamiento un  $k_{L,a}$  constante que permita sustentar cierta demanda de oxígeno del cultivo. Sin embargo, más que la capacidad de transferencia de oxígeno ( $k_{L,a}$ ) es la velocidad de transferencia de oxígeno la determinante en el rendimiento de un proceso aerobio. Es ampliamente conocido que la VTO depende del gradiente de concentración de oxígeno y del  $k_{L,a}$ . En biorreactores aireados agitados mecánicamente, el  $k_{L,a}$  depende de las condiciones de operación (temperatura, P/V, velocidad de agitación y flujo de gas), de la geometría del biorreactor, impulsor y difusor de gas y de las propiedades físicas de la fase líquida (viscosidad, tensión superficial y densidad).

En la literatura existen diversos métodos reportados para caracterizar un cultivo aerobio en términos de la transferencia de oxígeno, principalmente a través de la medición del  $k_{L,a}$ . Entre los más utilizados para medirlo se encuentran el método de oxidación de sulfito, el método dinámico y el método de balance de gas. Este último, se basa en la medición de oxígeno en la fase gaseosa utilizando un sensor paramagnético o un espectrómetro de masas. Todos estos

métodos presentan limitaciones durante los diferentes estados del cultivo. Por ejemplo, el método dinámico puede ser utilizado con alta precisión durante el estado inicial del cultivo, cuando el consumo de oxígeno es bajo y la TOD es alta. Al progresar el cultivo, el microorganismo crece y aumenta el consumo de oxígeno, disminuyendo la TOD. En ese periodo el método de balance de gas da una mayor exactitud en la medición de  $k_{La}$  (Patel y Thibault 2004).

Otra posibilidad es predecir el  $k_{La}$  a través de correlaciones empíricas establecidas tanto para fluidos Newtonianos y no Newtonianos. Sin embargo, estas correlaciones son válidas sólo en el rango de operación establecido y en algunos casos, resultan específicas para el sistema donde fueron determinadas.

Una forma generalizada para mostrar la dependencia del  $k_{La}$  es:

$$k_{La} \propto (P/V)^a (v_s)^b (N)^c (\eta)^{-d} \quad (2.2)$$

donde  $P_g/V$  es la potencia volumétrica suministrada,  $v_s$  la velocidad superficial del gas,  $N$  la velocidad de agitación del reactor y  $\eta$  la viscosidad del cultivo.

Considerando la dependencia de la VTO con el  $k_{La}$  ( $VTO = k_{La} (C^*_{o_2} - C_{o_2})$ ), cambios en la velocidad de agitación determinarán efectos sobre la velocidad de transferencia de oxígeno del cultivo. De ahí que en este trabajo se propone manipular la VTO mediante cambios en la velocidad de agitación del cultivo.

### **3. Justificación del proyecto**

En la literatura existe información relacionada con la influencia que tiene el oxígeno disuelto (bajo condiciones controladas de TOD) sobre el peso molecular y la concentración del alginato producido por *A. vinelandii* (Sabra et al. 2000; Peña et al. 2000, Trujillo-Roldán et al. 2004). Sin embargo, son limitados los estudios acerca de la producción de alginato por *A. vinelandii* bajo condiciones no controladas de oxígeno. En cultivos sin control del oxígeno disuelto y debido a la alta velocidad de respiración que tiene *A. vinelandii*, se observa que la tensión de oxígeno disuelto es cercana a cero durante la etapa de crecimiento celular. En estas condiciones (TOD  $\sim$  cero), un parámetro que resulta útil para estudiar la producción de alginato es la velocidad de transferencia de oxígeno (VTO). Por tal motivo, en este trabajo se implementó la medición en línea de la VTO en cultivos realizados en un biorreactor de 3.0 L, con el fin de evaluar su influencia sobre la producción de alginato y el peso molecular del polímero.

## 4. Hipótesis y objetivos

### 4.1. Hipótesis

- En cultivos limitados por oxígeno, el peso molecular del alginato sintetizado por *Azotobacter vinelandii* durante la etapa de crecimiento celular está determinado por la velocidad de transferencia de oxígeno.

### 4.2. Objetivo general

- Determinar, en cultivos limitados por oxígeno, cómo influye la velocidad de transferencia de oxígeno sobre la producción de alginato y el peso molecular del polímero sintetizado por *Azotobacter vinelandii*.

### 4.3. Objetivos específicos

- Desarrollar un sistema de análisis de oxígeno gaseoso que permita estimar en línea la velocidad de transferencia de oxígeno en cultivos de *A. vinelandii* realizados en un biorreactor.
- Establecer el efecto de diferentes velocidades de transferencia de oxígeno sobre el crecimiento celular, la evolución de la tensión de oxígeno disuelto y el consumo de sustratos en cultivos de *A. vinelandii* realizados en un biorreactor de 3.0 L.

- Determinar el efecto que tiene la velocidad de transferencia de oxígeno sobre la síntesis de alginato y PHB.
  
- Evaluar y correlacionar la influencia de la velocidad de transferencia de oxígeno sobre el peso molecular del alginato sintetizado por *A. vinelandii* bajo condiciones de limitación de oxígeno.
  
- Determinar la influencia que tiene la velocidad de transferencia de oxígeno sobre la expresión de los genes *algL* y *alg8* en células de *A. vinelandii*, estableciendo sus implicaciones sobre la producción de alginato.

## 5. Materiales y métodos

### 5.1. Microorganismo y mantenimiento de la cepa

En el presente trabajo se utilizó la cepa de *Azotobacter vinelandii* ATCC 9046. El microorganismo se conservó en tubos inclinados (*slants*) a 4° C, llevando a cabo su resiembra cada 30 días.

### 5.2. Medio de cultivo

En la tabla 5.1 se describe el medio de cultivo utilizado en este trabajo.

**Tabla 5.1.** Composición del medio de cultivo utilizado en este trabajo.

<i>Componente</i>	<i>(g L<sup>-1</sup>)</i>
Sacarosa	20
Acetato de amonio	1.0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.66
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.16
CaSO <sub>4</sub>	0.05
NaCl	0.2
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0.2
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	0.0029
FeSO <sub>4</sub>	0.027

Las sales de potasio, la sacarosa y el acetato de amonio se disolvieron en agua destilada y se ajustó el pH a 7.2 con NaOH 2 N. El sulfato de calcio y las sales restantes se disolvieron por separado. Para evitar precipitaciones, las tres soluciones se esterilizaron por separado a 121° C durante 20 minutos y una vez estériles todas se mezclaron en una campana de flujo laminar.

### **5.3. Preparación del inóculo**

En caja Petri se adicionaron 20-25 mL de medio de cultivo con la composición descrita anteriormente, incluyendo agar en una concentración de 18 g L<sup>-1</sup>. La cepa fue transferida desde un tubo inclinado (*slant*) a una caja Petri con medio de cultivo e incubada por 72 h a 29° C en una estufa (Boekel Scientific).

El inóculo para el biorreactor fue preparado en matraces Erlenmeyer de 500 mL con 100 mL de medio. En los matraces se inocularon células generadas en cajas (2 asadas) y estos fueron incubados a 29° C y 200 rpm durante 24 h (incubadora New Brunswick Scientific Innova 4330). El biorreactor fue inoculado con 200 mL de cultivo generado en el matraz, lo cual correspondió al 10 % del volumen total de trabajo.

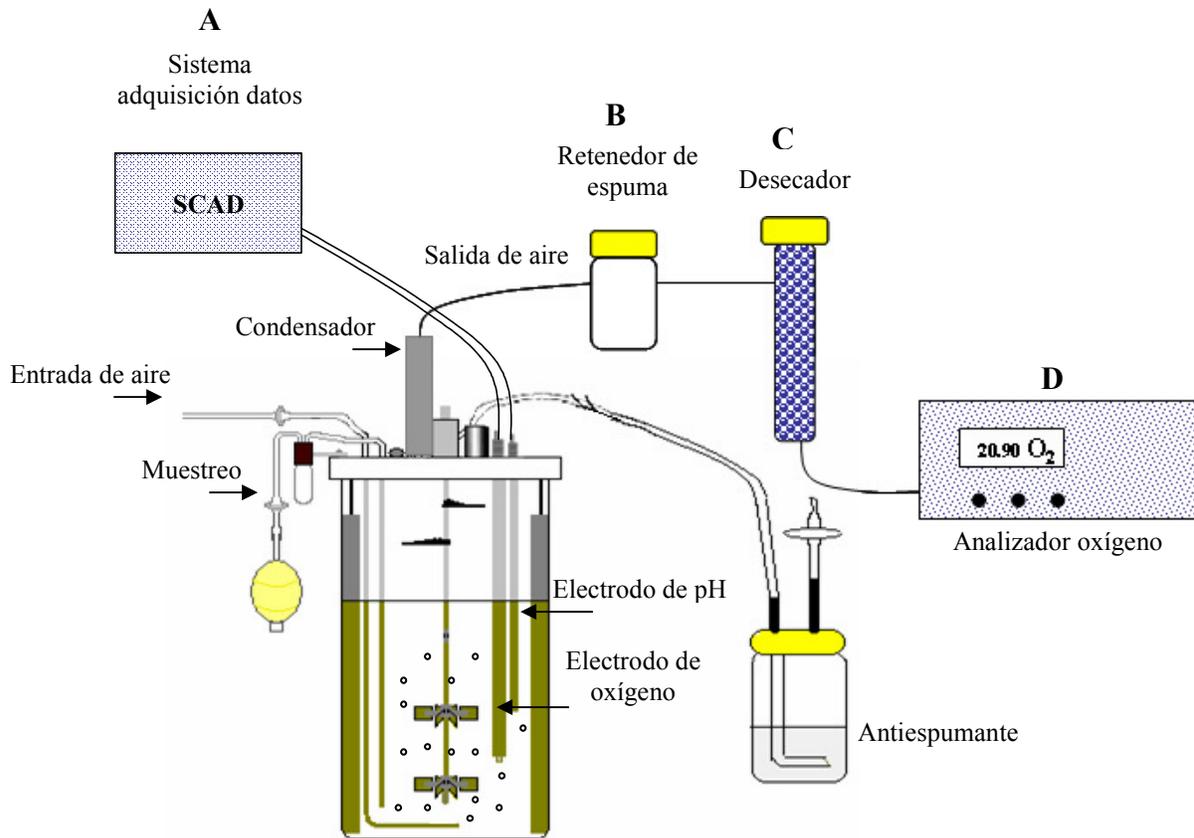
### **5.4. Descripción del biorreactor y las condiciones de operación**

Los cultivos se llevaron a cabo en un biorreactor Applikon (Schiedam, Netherlands) de 3.0 L de volumen nominal, con un volumen de trabajo de 2.0 L, equipado con 2 impulsores tipo turbina Rushton (diámetro = 5 cm) y un difusor de aire con 7 orificios. Se utilizaron 3 puertos del biorreactor: uno para inoculación, adición de sales y CaSO<sub>4</sub> estériles, otro para muestreo y otro

para la adición de antiespumante (silicona al 10 %). El antiespumante se adicionó manualmente utilizando una bomba peristáltica.

Para monitorear la evolución de la tensión de oxígeno disuelto (TOD) se utilizó un electrodo polarográfico marca Ingold (Columbus, USA). El pH se midió en línea utilizando un electrodo de pH marca Ingold. La evolución de la TOD y el pH durante el transcurso del cultivo se registraron utilizando un sistema de adquisición de datos (SCAD) (Peña et al. 2000). La TOD ni el pH fueron controlados durante el cultivo.

Los cultivos se realizaron a 29° C y la temperatura del cultivo se controló utilizando un baño termostático de circulación de agua. El flujo de aire fue 1.0 L min<sup>-1</sup> (0.5 vvm) y se midió utilizando un rotámetro (0.5-2.0 L min<sup>-1</sup>). El biorreactor operó a diferentes velocidades de agitación: 260, 340, 400, 450 y 560 rpm. En la figura 5.1 se muestra un esquema del sistema utilizado en este trabajo.



**Figura 5.1.** Esquema del sistema utilizado en el desarrollo de este trabajo. La señal de los electrodos de pH y TOD fue adquirida por un sistema de adquisición de datos en línea (A). El flujo de gas desde la salida del biorreactor sale hacia un frasco retenedor de espuma (B) y luego entra a una columna de vidrio con sílica gel (C), donde se remueve la humedad y queda la muestra acondicionada para ingresar al analizador de oxígeno (D).

### **5.5. Determinación de la concentración de biomasa**

La biomasa se determinó midiendo la densidad óptica de los cultivos a una longitud de onda de 540 nm (espectrofotómetro Beckman DU 650). Para obtener la concentración celular, la densidad óptica fue correlacionada con la concentración celular en ( $\text{g L}^{-1}$ ) obtenida previamente mediante una curva de calibrado. El procedimiento realizado y la curva de calibrado se muestran en el Anexo B.

### **5.6. Cuantificación del alginato**

La técnica utilizada para extraer y cuantificar el alginato se basó en la precipitación del polisacárido y su determinación gravimétrica. El procedimiento realizado se describe en el Anexo C.

### **5.7. Determinación de la concentración de sacarosa**

La determinación de sacarosa fue realizada utilizando el método de  $\beta$ -fructofuranosidasa-DNS (Miller, 1959). El método se basa en la hidrólisis de la sacarosa usando la enzima invertasa y la posterior medición de los azúcares reductores libres por la reducción del ácido dinitrosalicílico (DNS). En la reacción se forma un compuesto nitroaminado colorido (amarillo), cuya densidad óptica medida a 540 nm es proporcional a la concentración de grupos reductores. El procedimiento aplicado y la curva de calibración obtenida se describen en el Anexo D.

### **5.8. Determinación de la concentración de amonio por el método fenol-hipoclorito**

La determinación de amonio fue realizada utilizando el método fenol-hipoclorito, propuesto por Kaplan (1969). El método se basa en la transformación del amonio a cloramina mediante la acción del hipoclorito. La cloramina sintetizada reacciona con el fenol originando el cromógeno p-hidroxifenil imino benzoquinona, el cuál absorbe a 635 nm y cuya densidad óptica es proporcional a la concentración de amonio. El procedimiento aplicado y la curva de calibración obtenida se describen en el Anexo E.

### **5.9. Determinación de PHB por HPLC-UV**

*Recuperación del PHB:* el PHB fue extraído de las células de acuerdo al procedimiento descrito por Hahn et al. (1993) con algunas adaptaciones. El procedimiento realizado se describe en el Anexo F.

*Cuantificación del PHB:* durante el desarrollo de este trabajo, se implementó la determinación de PHB utilizando la técnica de HPLC (equipo Waters, 2695) de acuerdo a lo reportado previamente por Karr et al. (1983). La cuantificación de PHB se basó en la determinación de ácido crotonico (producto de la hidrólisis ácida de PHB) utilizando un detector UV (211 nm) y una columna de intercambio iónico Aminex HPX-87H. La fase móvil utilizada fue H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.014 N con un flujo de 0.7 mL min<sup>-1</sup> y una temperatura de 50°C. El tiempo de corrida de cada muestra fue de 30 min y las muestras fueron inyectadas por duplicado. La señal del detector fue procesada con un programa PC compatible (Empower, Waters). La implementación de esta técnica consistió en evaluar una serie de ensayos analíticos (de acuerdo a la International Conference on

Harmonisation, ICH). En el Anexo G se muestran los cromatogramas y los ensayos de validación realizados en la puesta a punto del método de cuantificación de PHB.

Las soluciones estándares utilizadas y la curva de calibración obtenida se muestran en el Anexo F.

### **5.10. Determinación de acetato por HPLC**

El acetato fue determinado por la técnica de HPLC (equipo Waters, 2695) aplicando el mismo procedimiento de cuantificación de PHB descrito anteriormente, sólo que el tiempo de corrida de cada muestra fue de 15 min. La concentración de acetato fue extrapolada utilizando una curva de calibrado (Anexo H).

### **5.11. Determinación del peso molecular promedio del alginato**

El peso molecular promedio del alginato fue determinado por cromatografía de filtración en gel (GPC) usando una serie de columnas Ultrahidrogel (UG 500 y 2000, Waters) de 7.8 mm (diámetro interno) por 300 mm, acopladas a un equipo de HPLC (Waters, 2695) con un detector de índice de refracción (Waters, 2414). Se utilizó como fase móvil  $\text{NaNO}_3$  0.1 M a 35° C con un flujo de  $0.9 \text{ mL min}^{-1}$ . El tiempo de corrida de cada muestra fue de 30 minutos. Las muestras fueron inyectadas por duplicado. La señal del detector fue procesada con un programa PC compatible (Empower, Waters). La calibración de las columnas se llevó a cabo utilizando pululanos de *Aureobasidium pullulans* como estándares de peso molecular con un rango de 5,800 a 788,000 Da. Se inyectaron 100  $\mu\text{L}$  de muestra para el análisis.

El procedimiento de preparación de muestras para el análisis de peso molecular por GPC se muestra en el Anexo I.

### **5.12. Determinación de la viscosidad del caldo de cultivo**

La viscosidad del caldo de cultivo se midió en un viscosímetro de cono y plato (Wells-Brookfield LVT, Series 82198). Todas las determinaciones se hicieron a temperatura ambiente a 6 rpm y usando el cono CP-52, lo cual corresponde (de acuerdo a los datos del fabricante) a una velocidad de deformación de  $12 \text{ s}^{-1}$ . El viscosímetro fue calibrado antes de su utilización con aceites de referencia Brookfield de 100, 500 y 1000 mPa s. Tomando como referencia estos valores, se estimó un factor de 21.689 para el cálculo de la viscosidad.

### **5.13. Microscopía electrónica**

Por microscopía electrónica se analizaron células cultivadas a velocidades de agitación de 260 rpm (20 h de cultivo) y 560 rpm (17 h de cultivo). Las células fueron removidas desde el medio de cultivo, lavadas con NaCl 1.0 M y resuspendidas en glutaraldehído al 3 % (v/v), con amortiguador de cacodylato 0.1 M. Las células fueron fijadas por 1 h, lavadas y colocadas en  $\text{OsO}_4$  1 % (v/v) en solución amortiguadora de cacodylato por 1 h a  $4^\circ \text{C}$  y finalmente lavadas e hidratadas. Los cortes fueron examinados con un microscopio EM-900 Zeiss con amplificación de  $\times 30,000$ .

#### **5.14. Recuperación, purificación de RNA y análisis por PCR en tiempo real (RT-PCR)**

20 mL de cultivo (muestreado en fase de crecimiento celular) fueron centrifugados (8,000 rpm por 10 min) y las células resultantes fueron resuspendidas en 5 mL de MgSO<sub>4</sub> 0.1 M y 20 µL de proteasa. El procedimiento aplicado para la recuperación y purificación del RNA fue adaptado de Barry et al. (1992). Complementariamente, las muestras fueron purificadas utilizando el Kit Roche (Cat. No. 11 828 665 001), aplicando el protocolo descrito para tal efecto.

**Síntesis de cDNA.** El RNA, se cuantificó en espectrofotómetro y se verificó en un gel su integridad y que las concentraciones cuantificadas correspondan a lo observado, esto para asegurarse de utilizar las mismas cantidades de RNA de las distintas condiciones analizadas. Para la reverso transcripción (síntesis de cDNA) se usaron 200 ng de RNA de cada condición y se utilizó un Kit Revert Aid<sup>TM</sup> H minus First Strand cDNA Synthesis, de Fermentas Life Science, según la metodología recomendada.

El RNA se diluyó a 100 ng µl<sup>-1</sup> en agua con DEPC. Se tomaron 2 µl de RNA (200 ng) y se agregaron 2 pmoles de cada primer (reverso), tanto de los genes cuya expresión se cuantificó (*algL* y *alg8*), como del gen control (*gyrA*). Para el diseño se utilizó el programa disponible para tal efecto en [http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www\\_slow.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www_slow.cgi).

El volumen de la reacción se levó a 12 µl con agua DEPC. Se mezcló y centrifugó brevemente. Posteriormente se añadió:

Buffer de reacción 5X	4 $\mu$ l
Inhibidor de nucleasas RiboLock de 20u $\mu$ l <sup>-1</sup>	1 $\mu$ l
Mezcla de dNTPs 10 mM	2 $\mu$ l

Se incubó a 37°C por 5 minutos y luego se puso 1  $\mu$ l de la enzima reverso transcriptasa RevertAid™ (200 u  $\mu$ l<sup>-1</sup>), quedando un volumen final de 20  $\mu$ l. La mezcla se incubó a 42°C por 60 min. La reacción se detuvo calentando a 70°C por 10 min.

**PCR de tiempo real.** La PCR de tiempo real se realizó con un equipo ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Perkin-Elmer/Applied Bio-systems) usando SYBR Green PCR Master Mix (Perkin-Elmer/Applied Bio-systems). Para estas reacciones, los cDNAs resultantes de la reverso transcripción de 200 ng de RNA de cada condición se diluyeron 1:10 en agua estéril, y se tomó 1  $\mu$ l. Se añadieron 10  $\mu$ l de la mezcla maestra SYBR Green, 7  $\mu$ l de agua estéril y 2  $\mu$ l de los oligos “forward” y ”reverse” correspondientes al gen cuyo cDNA se deseaba cuantificar (concentración final de los oligos 250 nM). Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo de 10 min a 95°C, y 40 ciclos de dos pasos, a 95 °C por 15 s y a 60°C por 60 s. El tamaño de todos los amplímeros fue 100-101 bp. Todas las reacciones de RT PCR se realizaron por triplicado para cada gen y para cada condición de agitación. Adicionalmente, para cada gen la cuantificación se realizó utilizando dos amplificaciones independientes usando dos pares de oligos diferentes. La cantidad de mRNA del gen *gyrA* (que codifica para una subunidad de la DNA girasa) se usó como control interno para normalizar los resultados obtenidos para los mRNAs de *algL* y *alg8* de las distintas condiciones. La técnica utilizada para analizar los datos fue el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  reportado por Livak y Shmittgen (2001).

Oligos empleados empleados:

algL1US	5'-CTGCTCACCACCGAGTACAA-3'
algL1DS*	5'-GCGAACTGGAGAATTCAGG-3'
algL2US	5'-ATGCGCTACATGGAGAAAGG-3'
algL2DS*	5'-TTGTACTCGGTGGTGAGCAG-3'
alg8-1US	5'-GATCATCGGCTCCATCAAAT-3'
alg8-1DS*	5'-GTCCGGAAAGAGACAACAGC-3'
alg8-2US	5'-CGATCCTTCCCATGTGTTTC-3'
alg8-2DS*	5'-CAGTTGATCGCCTCCTTGAT-3'
gyrAFw2	5'-CCAGCAAGGGCAAGGTCTA-3'
gyrARev*	5'-TCGTCCAGCGGCAACAGGT-3'
gyrA2US	5'-CGTGATGCTGATCAAGTTGG-3'
gyrA2DS*	5'-TCCTCGTCGTCGAATAGCTC-3'

Los oligos marcados \* corresponden a oligos reversa (usados en reverso transcripción y en RT-PCR).

### **5.15. Implementación del sistema de análisis de oxígeno en fase gas y estimación de la velocidad de transferencia de oxígeno**

Se utilizó un analizador paramagnético (Teledyne Instruments, USA) para medir el oxígeno en el flujo gaseoso de la salida del biorreactor y se implementó un sistema de acondicionamiento de la muestra gaseosa. En un principio, esta implementación fue considerada trivial; sin embargo,

se presentaron diferentes dificultades experimentales de implementación que imposibilitaron, en una primera etapa, una adecuada estabilidad de la señal de oxígeno detectada por el analizador. A continuación, se enumeran y detallan las diferentes acciones implementadas que permitieron una correcta medición de oxígeno:

- *Prevención del ingreso de espuma al analizador paramagnético:* se acondicionó un frasco receptor de espuma (Fig. 5.1), el cual se instaló a la salida del condensador del biorreactor y mediante el cual fue posible decantar la espuma que en algunos cultivos salió desde el reactor. Este frasco permitió el paso libre del flujo de gas de salida del reactor hacia el analizador.
- *Remoción de la humedad del gas de salida del biorreactor:* entre la salida del frasco de retención de espuma y el analizador paramagnético se instaló una columna de vidrio (30 cm) rellena con sílica gel (Fig. 5.1).
- *Determinación del punto de rocío del gas de salida del biorreactor:* rutinariamente, a la salida de la columna de sílica gel, se midió el punto de rocío de la muestra gaseosa. Durante las primeras 10-12 h de cultivo, la medición del punto de rocío se mantuvo en un rango adecuado para el análisis (descrito por el fabricante), periodo después del cual fue necesario regenerar la sílica gel de la columna. Antes de conectar la columna con una nueva sílica gel y hacer pasar gas por ella, fue necesario acondicionarla con gas proveniente del biorreactor (por 15-20 min) sin hacer pasar esa corriente al analizador.

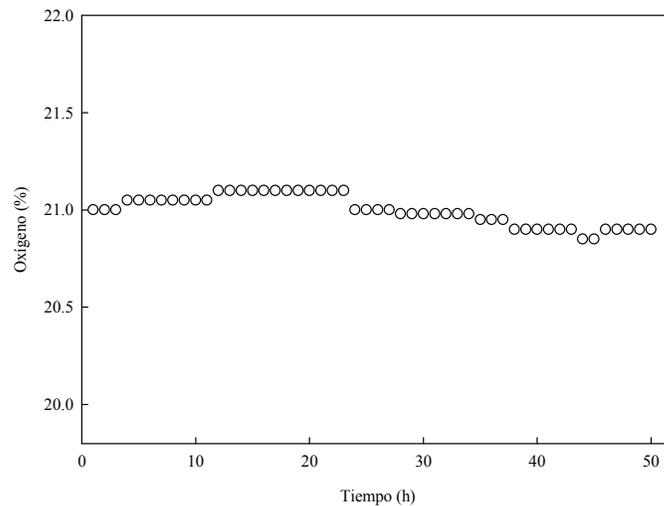
- *Control de la temperatura ambiente cercana al analizador:* se construyó una cámara de material aislante con un ventilador mecánico al interior. En esta cámara, se instaló el analizador paramagnético. Este dispositivo evitó un incremento importante de la temperatura ambiente durante el tiempo que duraron los experimentos. Así, durante los experimentos, la temperatura ambiental cercana al analizador osciló entre 28° y 32° C, lo cual no afectó sensiblemente la detección de oxígeno.
- *Ajuste del flujo de gas de entrada al analizador:* para ello, se instaló un rotámetro (flujo máximo de 1.5 L min<sup>-1</sup>) entre la salida del gas desde la columna de sílica gel y el analizador de oxígeno.

En la puesta a punto del analizador de oxígeno, se analizaron mezclas conocidas de gases (de oxígeno y nitrógeno) durante un periodo de tiempo de 50 h, con lo cual se evaluó la estabilidad de la señal entregada por el analizador. En la figura 5.2 se muestra un ejemplo típico de la respuesta obtenida por el analizador (promedio de tres mediciones independientes), para una mezcla de composición conocida (21 % de oxígeno).

Los resultados mostraron que la señal de oxígeno fue estable, obteniéndose un valor promedio de oxígeno de  $20.99 \pm 0.058$  %.

Es importante destacar, que la menor diferencia de oxígeno (durante la etapa de crecimiento del microorganismo) detectada entre la salida y la entrada correspondió a 0.1 % (con esta diferencia de oxígeno, se puede calcular la velocidad de transferencia de oxígeno, ver más adelante). Considerando que la desviación estándar del análisis de oxígeno desde el gas de salida

del reactor sin presencia de microorganismo fue de 0.058 % (mostrado anteriormente), entonces, es posible detectar sin inconvenientes la variación de oxígeno a la salida del reactor durante el transcurso del cultivo.



**Figura 5.2.** Evolución del oxígeno en fase gas desde la salida del biorreactor sin microorganismos. Análisis de una mezcla 21 % oxígeno y 79 % nitrógeno, con un flujo de gas de  $1.0 \text{ L min}^{-1}$ . Se muestra el promedio de tres mediciones independientes.

La velocidad de transferencia de oxígeno (VTO) se estimó a partir del análisis en línea del nivel de oxígeno gaseoso a la salida del biorreactor, utilizando la ecuación propuesta por Zeng et al. (1994):

$$VTO = \frac{V_G}{V_L V_N} (X_{in} - X_{out}) \quad (5.1)$$

donde  $V_G$  es el flujo de gas en la entrada ( $L h^{-1}$ ),  $V_L$  el volumen de trabajo (L),  $V_N$  el volumen molar ( $L mol^{-1}$ ),  $X_{in}$  y  $X_{out}$  la fracción mol de oxígeno en la entrada y salida, respectivamente.

### 5.16. Estimación de la máxima velocidad de consumo de oxígeno

Con el fin de analizar la existencia de condiciones de limitación de oxígeno en los cultivos, se realizó un análisis teórico que consistió en calcular la máxima velocidad de consumo de oxígeno ( $VCO_{max}$ ) a las diferentes condiciones estudiadas. La siguiente ecuación se aplicó para calcular  $VCO_{max}$ :

$$VCO_{max} = \frac{\mu_{max} X}{Y_{x/o}} \quad (5.2)$$

donde  $\mu_{max}$  es la máxima velocidad específica de crecimiento ( $h^{-1}$ ),  $X$  es la concentración de biomasa ( $g L^{-1}$ ) y  $Y_{x/o}$  ( $g mmol O_2^{-1}$ ) el rendimiento de oxígeno necesario para el crecimiento. Para el cálculo de la  $VCO_{max}$  se consideró el  $Y_{x/o}$  calculado a partir del ajuste de mínimos cuadrados de la ecuación 6.3 (ver resultados y discusión).

### 5.17. Cálculo de la velocidad específica de consumo de oxígeno

La velocidad específica de consumo de oxígeno ( $q_{o2}$ ) fue calculada a partir de los datos experimentales de la  $VTO_{max}$  y la concentración de biomasa ( $X$ ), utilizando para ello la siguiente ecuación:

$$q_{o2} = \frac{VTO_{max}}{X} \quad (5.3)$$

### 5.18. Cálculo de la velocidad específica de crecimiento

Los datos obtenidos experimentalmente de la cinética de crecimiento celular fueron descritos por la ecuación logística (Klimek y Ollis 1980; Peña et al. 2000; Trujillo-Roldán et al. 2001):

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \left( 1 - \frac{X}{X_{\max}} \right) \quad (5.4)$$

donde  $\mu$  es la velocidad específica de crecimiento ( $\text{h}^{-1}$ ) y  $X_{\max}$  es la concentración máxima de biomasa ( $\text{g L}^{-1}$ ). Integrando la ecuación 5.4, considerando que  $X_0 = X(t=0)$  y reordenando los términos se obtiene la ecuación 5.5, la cual describe el crecimiento bacteriano en el tiempo.

$$X_{(t)} = \frac{X_0 e^{\mu t}}{1 - (X_0 / X_{\max})(1 - e^{\mu t})} \quad (5.5)$$

Reordenando términos, se obtiene:

$$\mu t = -\ln[(X_{\max} / X_0) - 1] + \ln[(X_{(t)} / X_{\max}) / (1 - (X_{(t)} / X_{\max}))] \quad (5.6)$$

Al graficar  $\ln[(X_{(t)} / X_{\max}) / (1 - (X_{(t)} / X_{\max}))]$  contra el tiempo se obtuvo la velocidad específica de crecimiento (representada por la pendiente del gráfico) para cada condición evaluada.

Todos los experimentos fueron realizados por triplicado y los resultados que se presentan corresponden al promedio de las corridas independientes. Las figuras muestran el valor promedio y la desviación estándar entre las réplicas. Las diferencias entre el promedio de los cultivos fueron evaluadas por una prueba de t-student's comparativa ( $p=0.05$ ).

### 5.19. Estrategia experimental

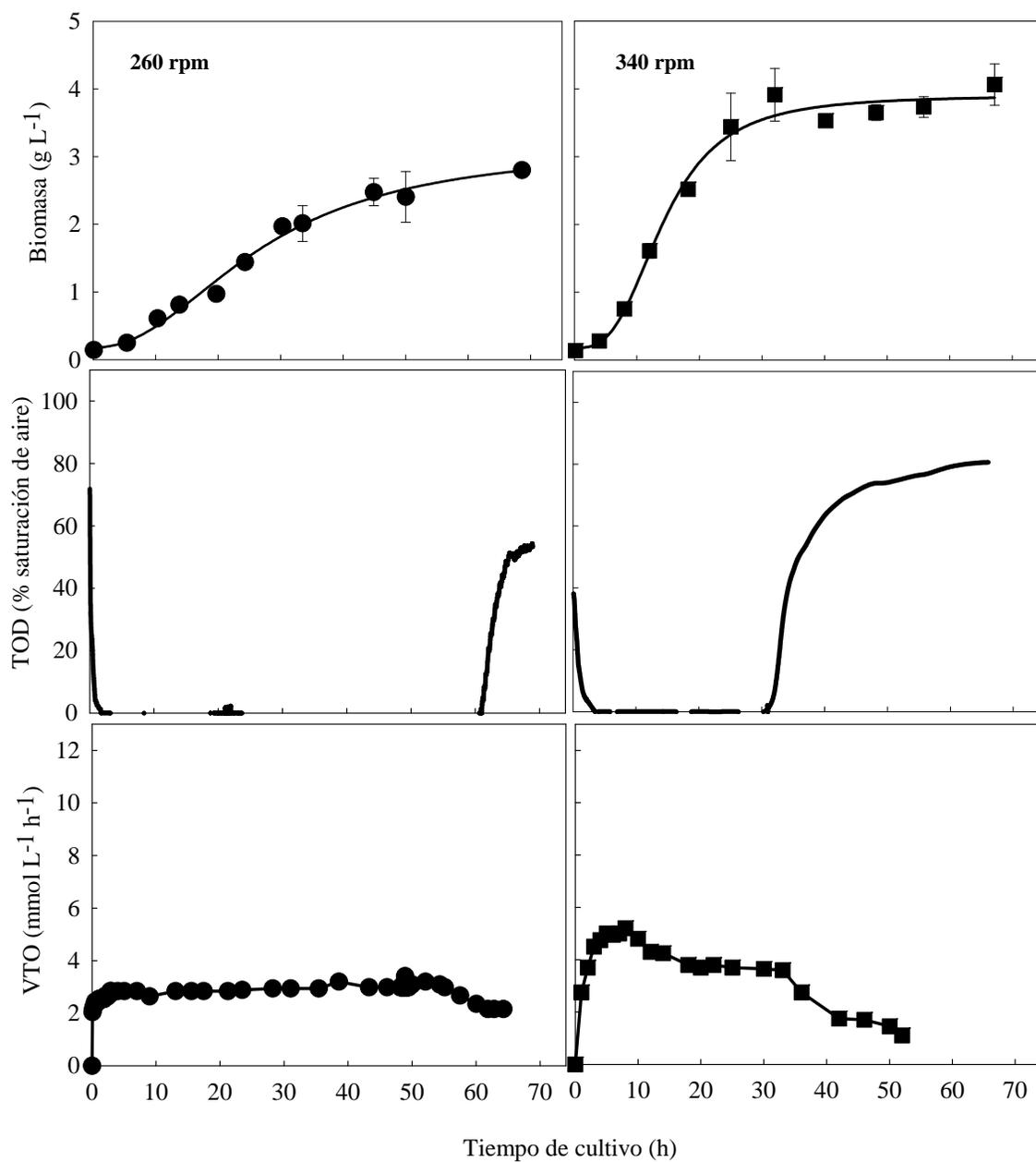
En la literatura sólo existe un estudio donde se muestra la variación de la velocidad de transferencia de oxígeno en cultivos productores de alginato (Peña et al. 2007). En ese estudio, realizado en matraces, la tendencia de la VTO durante el transcurso del cultivo mostró un perfil característico de cultivos limitados por oxígeno, ya que fue constante durante el crecimiento celular. Sin embargo, no fue determinado el posible efecto de la VTO sobre el peso molecular del alginato. Con este antecedente, el objetivo del presente trabajo fue establecer cómo el peso molecular y la concentración del alginato sintetizado durante el crecimiento celular de *A. vinelandii* son influenciados por la velocidad de transferencia de oxígeno en cultivos llevados a cabo en un biorreactor. Para evaluar la influencia de la velocidad de transferencia de oxígeno, se implementó un sistema de análisis de oxígeno en la fase gas a la salida del biorreactor. Se realizaron diferentes cultivos de *A. vinelandii* en biorreactor, con un medio de cultivo definido y utilizando amonio como fuente de nitrógeno. Los cultivos fueron realizados a diferentes velocidades de agitación (260, 340, 400, 450 y 560 rpm) y en cada uno de ellos se estimó en línea la velocidad de transferencia de oxígeno. En particular, durante el crecimiento celular se determinó (entre otros) el peso molecular promedio y la concentración del alginato producido durante el transcurso del cultivo y estos fueron correlacionados con la velocidad de transferencia de oxígeno medida.

## 6. Resultados y discusión

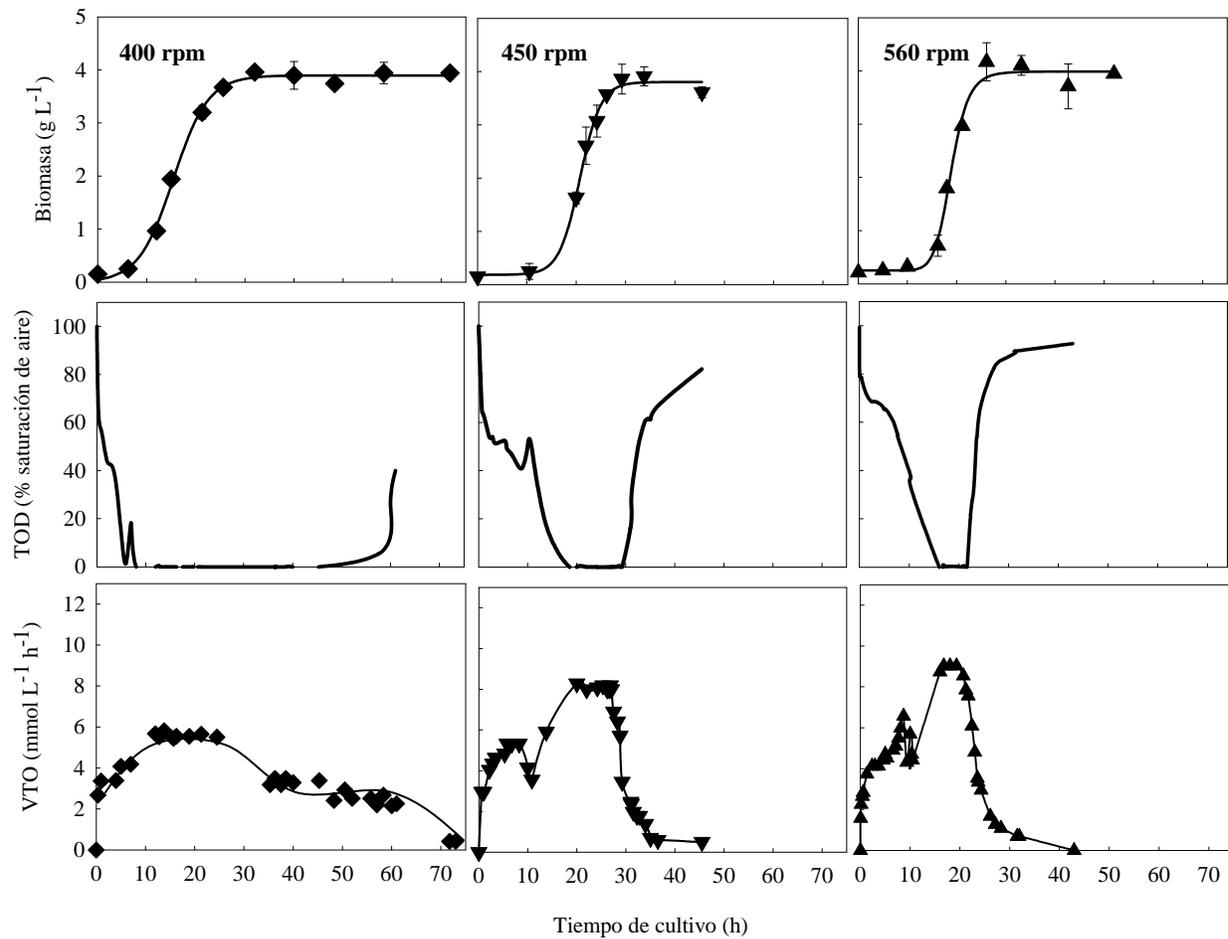
### 6.1. Influencia de la velocidad de agitación sobre el crecimiento celular, el consumo de sustratos y la velocidad de transferencia de oxígeno

Las figuras 6.1 y 6.2 muestran la evolución de la biomasa, de la tensión de oxígeno disuelto (TOD) y de la velocidad de transferencia de oxígeno (VTO) en cultivos realizados a 260, 340, 400, 450 y 560 rpm en el biorreactor de 3.0 L. En todas las condiciones estudiadas y durante las primeras horas de cultivo, la VTO mostró un incremento que fue relacionado con una disminución de la TOD del cultivo. En todos los casos, se alcanzó el valor máximo de la VTO durante el periodo de crecimiento celular. Este valor máximo de la VTO fue caracterizado por un perfil de tipo "plateau", el cual representa la máxima velocidad de transferencia de oxígeno ( $VTO_{max}$ ). La  $VTO_{max}$  corresponde a la máxima capacidad de transferencia gas-líquido del biorreactor y puede ser imaginada como un "techo" del sistema, definido por el más alto valor de la VTO mantenido durante el cultivo (Maier y Büchs 2001). Este comportamiento de la VTO ha sido descrito como característico de cultivos limitados por oxígeno y previamente ha sido observado en otros cultivos celulares (Stöckmann et al. 2003; Anderlei et al. 2004). Considerando esto, los cultivos de *A. vinelandii* presentaron limitación por oxígeno.

A una determinada condición de transferencia de oxígeno en un cultivo microbiano, las células incrementan su velocidad de consumo de oxígeno hasta alcanzar el "techo" del sistema. Cuando se alcanza esta máxima velocidad de transferencia de oxígeno, el cultivo se encuentra limitado por oxígeno y la velocidad de consumo de oxígeno de las células es función solamente



**Figura 6.1.** Evolución de la concentración de biomasa, tensión de oxígeno disuelto y velocidad de transferencia de oxígeno en cultivos de *A. vinelandii* realizados en biorreactor de 3.0 L bajo diferentes condiciones de agitación. (●) 260 rpm, (■) 340 rpm.



**Figura 6.2.** Evolución de la concentración de biomasa, tensión de oxígeno disuelto y velocidad de transferencia de oxígeno en cultivos de *A. vinelandii* realizados en biorreactor de 3.0 L bajo diferentes condiciones de agitación. (◆) 400 rpm, (▼) 450 rpm, (▲) 560 rpm.

de las condiciones de operación. Así, bajo esta condición, el metabolismo celular es influenciado directamente por la velocidad de transferencia de oxígeno. Es sabido que el metabolismo celular tiene diferencias significativas bajo condiciones totalmente aeróbicas o limitadas de oxígeno, lo cual ha sido bastante estudiado en otros cultivos microbianos (Varma et al. 1993; Charoenrat et al. 2005; Khatri y Hoffmann 2006; Zimmermann et al. 2006).

Cuando las condiciones de operación (velocidad de agitación en nuestro trabajo) fueron cambiadas, el "techo" del sistema fue alterado. Así, el valor máximo de la velocidad de transferencia de oxígeno fue influenciado por la velocidad de agitación. Se obtuvieron  $VTO_{max}$  de 3.0, 4.0, 5.5, 8.0 y 9.0  $mmol L^{-1} h^{-1}$  en los cultivos realizados a 260, 340, 400, 450 y 560 rpm, respectivamente.

Los cambios en la concentración de oxígeno disuelto (medida como tensión de oxígeno disuelto) en un cultivo dependen de la velocidad de transferencia de oxígeno desde las burbujas de aire al líquido, de la velocidad de consumo de oxígeno y las necesidades de mantenimiento por parte de las células. En nuestro trabajo, durante la etapa de crecimiento celular y a tempranas horas de comenzada esta fase (5 h en cultivos a 260, 340 y 400 rpm, 15 h en cultivos a 450 y 560 rpm), la TOD disminuyó a valores cercanos a cero, lo cual puede ser explicado por una alta velocidad de consumo de oxígeno (velocidad de respiración) que presentan las especies de *Azotobacter* (Post et al. 1983; Oelze 2000). Esta evidencia es indicativa de que durante el crecimiento celular no existió acumulación de oxígeno ( $dO_2/dt \approx 0$ ) y por lo tanto en esa etapa del cultivo, la velocidad de transferencia de oxígeno es igual a la velocidad de consumo de oxígeno del microorganismo (VCO). Entonces, considerando que la VCO es función de la

velocidad específica de crecimiento (ecuación 5.2) y que cuando existe limitación de oxígeno  $VTO \sim VCO$ , la velocidad específica de crecimiento queda determinada por la VTO, lo cual ha sido establecido previamente en otros cultivos microbianos (Beronio y Tsao 1993).

En un bioproceso aerobio, la velocidad de consumo de oxígeno (VCO) puede ser descrita por el consumo de oxígeno para funciones celulares de mantenimiento y de crecimiento celular. Esto puede ser expresado como:

$$VCO = \frac{(dX / dt)}{Y_{x/o}} + m_{o2}X \quad (6.1)$$

donde  $Y_{x/o}$  es el rendimiento de oxígeno necesario para el crecimiento,  $m_{o2}$  es el coeficiente de consumo de oxígeno para mantenimiento y  $X$  la concentración de biomasa. Se sabe que el modelo logístico describe el crecimiento de *A. vinelandii* (Klimek y Ollis 1980; Peña et al. 2000):

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \left( 1 - \frac{X}{X_{\max}} \right) \quad (6.2)$$

donde  $\mu$  es la velocidad específica de crecimiento y  $X_{\max}$  la máxima concentración de biomasa. Así, considerando ambas ecuaciones (6.1 y 6.2), es posible definir la velocidad de consumo de oxígeno (VCO) por la siguiente ecuación:

$$VCO = \frac{\mu X}{Y_{x/o}} \left( 1 - \frac{X}{X_{\max}} \right) + m_{o2}X \quad (6.3)$$

Como fue mencionado anteriormente, bajo limitación de oxígeno la VCO equivale a la VTO, por lo que a partir de las mediciones de la velocidad de transferencia de oxígeno, de la biomasa (promedio de 7-8 datos experimentales para cada condición) y el cálculo de  $\mu$ , se

resolvió la ecuación 6.3 mediante un ajuste de mínimos cuadrados y se calcularon los parámetros  $Y_{x/o}$  y  $m_{o_2}$  a las diferentes condiciones estudiadas. En la tabla 6.1 se muestran los valores obtenidos para ambos parámetros.

**Tabla 6.1.** Valores de los parámetros  $Y_{x/o}$  y  $m_{o_2}$  obtenidos por el ajuste de mínimos cuadrados de la ecuación 6.3.

<i>Velocidad de agitación</i> (rpm)	$m_{o_2}$ (mmol O <sub>2</sub> g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	$Y_{x/o}$ (g mmol O <sub>2</sub> <sup>-1</sup> )
<b>260</b>	0.011	0.018
<b>340</b>	0.011	0.025
<b>400</b>	0.093	0.023
<b>450</b>	0.017	0.023
<b>560</b>	0.020	0.026

Los  $Y_{x/o}$  calculados a las diferentes condiciones de transferencia de oxígeno no variaron de forma importante, alcanzando valores entre 0.018 y 0.026 g mmol O<sub>2</sub><sup>-1</sup>. En comparación con otros trabajos, los  $Y_{x/o}$  calculados en nuestro estudio, fueron similares a los reportados previamente por Nagai y Aiba (1972) en cultivos continuos de *A. vinelandii*, quienes reportaron un valor de 0.013 g mmol O<sub>2</sub><sup>-1</sup>. El coeficiente de consumo de oxígeno para mantenimiento ( $m_{o_2}$ ) presentó mayores diferencias en los distintos cultivos analizados (tabla 6.1). El valor más alto de  $m_{o_2}$  (0.093 mmol O<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) se obtuvo en los cultivos realizados a 400 rpm, siendo 560 rpm la más alta velocidad de agitación estudiada. A una mayor velocidad de agitación, se incrementó el suministro de oxígeno al cultivo (mayor es la VTO), pero no necesariamente aumentó el consumo de oxígeno para mantenimiento. Resultados similares para la tendencia de  $m_{o_2}$  con la velocidad

de agitación fueron reportados en cultivo continuo de *A. vinelandii* (Kuhla y Oelze 1988; Sabra et al. 2000). Estos autores indicaron que un incremento en la concentración de oxígeno del cultivo, no está relacionada directamente con un incremento en  $m_{O_2}$ . En esta misma línea, en cultivos de *E. coli* y estudiando la producción de benzaldehído liasa, Calik et al. (2004) observaron que a una velocidad de agitación de 750 rpm, el  $m_{O_2}$  fue 1.6 veces menor que cuando el cultivo se llevó a cabo a 375 rpm. Estas evidencias demuestran que el  $m_{O_2}$  no depende directamente del suministro de oxígeno, posiblemente porque corresponde a un consumo de oxígeno celular determinado por múltiples funciones microbianas.

Para evaluar teóricamente la existencia de limitación de oxígeno en los cultivos de *A. vinelandii*, se calculó la máxima velocidad de consumo de oxígeno ( $VCO_{max}$ ) y ésta fue comparada con los valores medidos de la  $VTO_{max}$ . En la tabla 6.2 se muestran los valores de  $VCO_{max}$  calculadas y  $VTO_{max}$  medidas para cada una de las velocidades de agitación estudiadas.

**Tabla 6.2.** Máxima velocidad de consumo de oxígeno calculada y velocidad de transferencia de oxígeno determinadas a diferentes velocidades de agitación.

<i>Velocidad de agitación</i> (rpm)	$VTO_{max}$ (mmol L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	$VCO_{max}$ calculada <sup>1</sup> (mmol L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
<b>260</b>	3.0	18.9
<b>340</b>	4.0	29.7
<b>400</b>	5.5	41.5
<b>450</b>	8.0	49.3
<b>560</b>	9.0	52.1

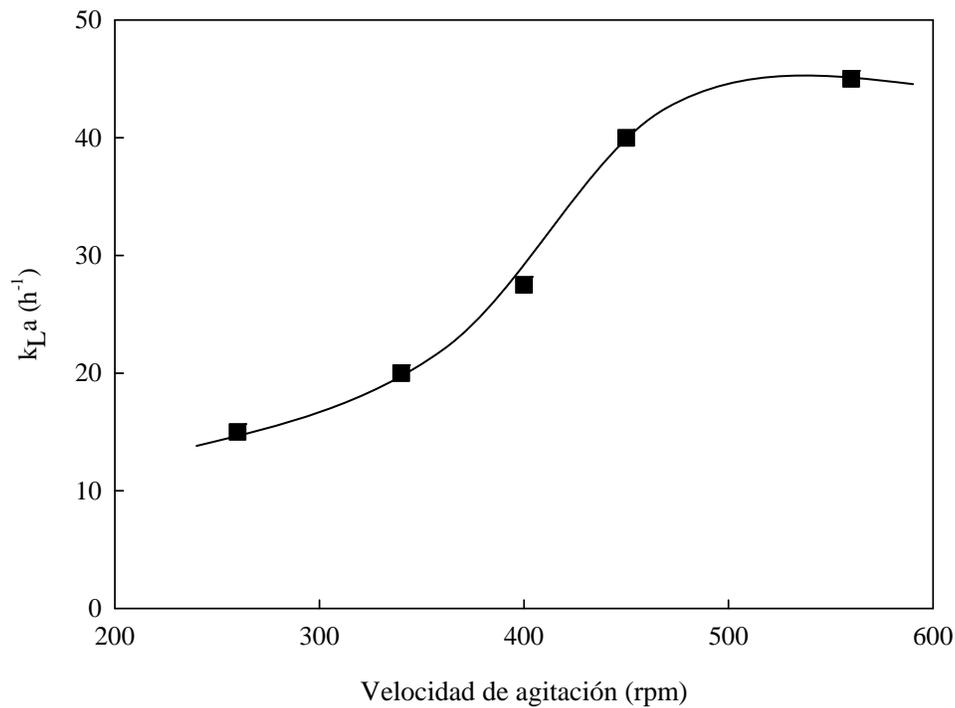
Los resultados indican que las  $VCO_{max}$  calculadas se incrementaron con el aumento de la velocidad de agitación y fueron entre 6 y 8 veces más altas que las  $VTO_{max}$  medidas en todos los casos estudiados. Esta evidencia es indicativa de que la máxima velocidad de consumo de oxígeno de las células excede la capacidad de entrega de oxígeno del sistema ( $VCO_{max} > VTO_{max}$ ), lo cual sustenta la existencia de limitación de oxígeno en los cultivos de *A. vinelandii*.

Al incrementarse la velocidad de agitación ( $k_La$  más alto) y por lo tanto al disminuir las limitaciones por transferencia de masa, es esperable que la concentración de biomasa se incremente conforme aumenta la velocidad de agitación y la VTO. Este comportamiento se obtuvo al aumentar la velocidad de agitación desde 260 a 340 rpm, siendo la máxima concentración de biomasa  $2.8 \text{ g L}^{-1}$  y  $3.6 \text{ g L}^{-1}$ , respectivamente. Sin embargo, a velocidades de agitación superiores a 340 rpm (entre 400 y 560 rpm), la biomasa máxima varió levemente, entre  $3.6$  y  $4.2 \text{ g L}^{-1}$ . En este sentido, un comportamiento similar fue reportado por Parente et al. (2000) en cultivos de *A. vinelandii* realizados a velocidades de agitación entre 300 y 700 rpm. Una posible explicación, podría estar relacionada con un desacoplamiento del metabolismo respiratorio, provocado por un aumento de la velocidad de consumo de oxígeno (a una más alta velocidad de agitación), lo cual se traduciría en una mayor velocidad de producción de  $CO_2$  y una consiguiente disminución en la producción de biomasa.

En los cultivos llevados a cabo a 450 y 560 rpm, se observó una disminución gradual de la TOD, la cual alcanzó valores cercanos a cero sólo después de 15 h de cultivo (Fig. 6.2). Este comportamiento fue diferente al obtenido en los cultivos realizados a 260, 340 y 400 rpm, en los cuales la TOD disminuyó a cero a tempranas horas de cultivo ( $< 5 \text{ h}$ ). Este perfil de la TOD

(a 450 y 560 rpm) está relacionado con una menor producción de biomasa y por lo tanto una menor demanda de oxígeno. Es así que antes de las 10 h de cultivo, en los cultivos a 340 rpm la concentración de biomasa se incrementó más de 5 veces (desde  $0.15 \text{ g L}^{-1}$  hasta  $0.80 \text{ g L}^{-1}$ ) y en cambio, por ejemplo, a 560 rpm, la concentración de biomasa (en ese mismo periodo de tiempo) sólo se duplicó (desde  $0.15 \text{ g L}^{-1}$  a  $0.30 \text{ g L}^{-1}$ ). Considerando que un aumento en la velocidad de agitación incrementa el  $k_{La}$  y por lo tanto se transfiere más oxígeno al medio (a las 15 h de cultivo se transfirieron  $89 \text{ mmol O}_2 \text{ L}^{-1}$  a 560 rpm y  $49 \text{ mmol O}_2 \text{ L}^{-1}$  a 340 rpm), es posible que un más alto nivel de oxígeno (a 450 y 560 rpm) tenga un efecto inhibitorio sobre el crecimiento celular, al menos durante las primeras 10 h de cultivo.

En los cultivos llevados a cabo a 450 rpm, el perfil de la VTO fue muy similar al que se obtuvo en los cultivos realizados a 560 rpm. El perfil de la VTO de ambos cultivos mostró dos valores máximos: uno cercano a  $5.5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  y el otro alrededor de  $8.0\text{-}9.0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , el cual correspondió a la máxima velocidad de transferencia de oxígeno durante el crecimiento celular. Es conocido que la VTO es proporcional a la diferencia entre la concentración al equilibrio y la de oxígeno disuelto presente en el seno del líquido, siendo la constante de proporcionalidad el coeficiente volumétrico de transferencia de masa ( $k_{La}$ ). Un incremento en la velocidad de agitación aumenta el  $k_{La}$  y la VTO. La figura 6.3 muestra la relación obtenida entre la velocidad de agitación y el  $k_{La}$  calculado (a partir del valor de la  $VTO_{\max}$ ) a las diferentes condiciones estudiadas. Se observa que el sistema utilizado alcanza su máxima capacidad de transferencia de masa a velocidades de agitación cercanas a 450 rpm.



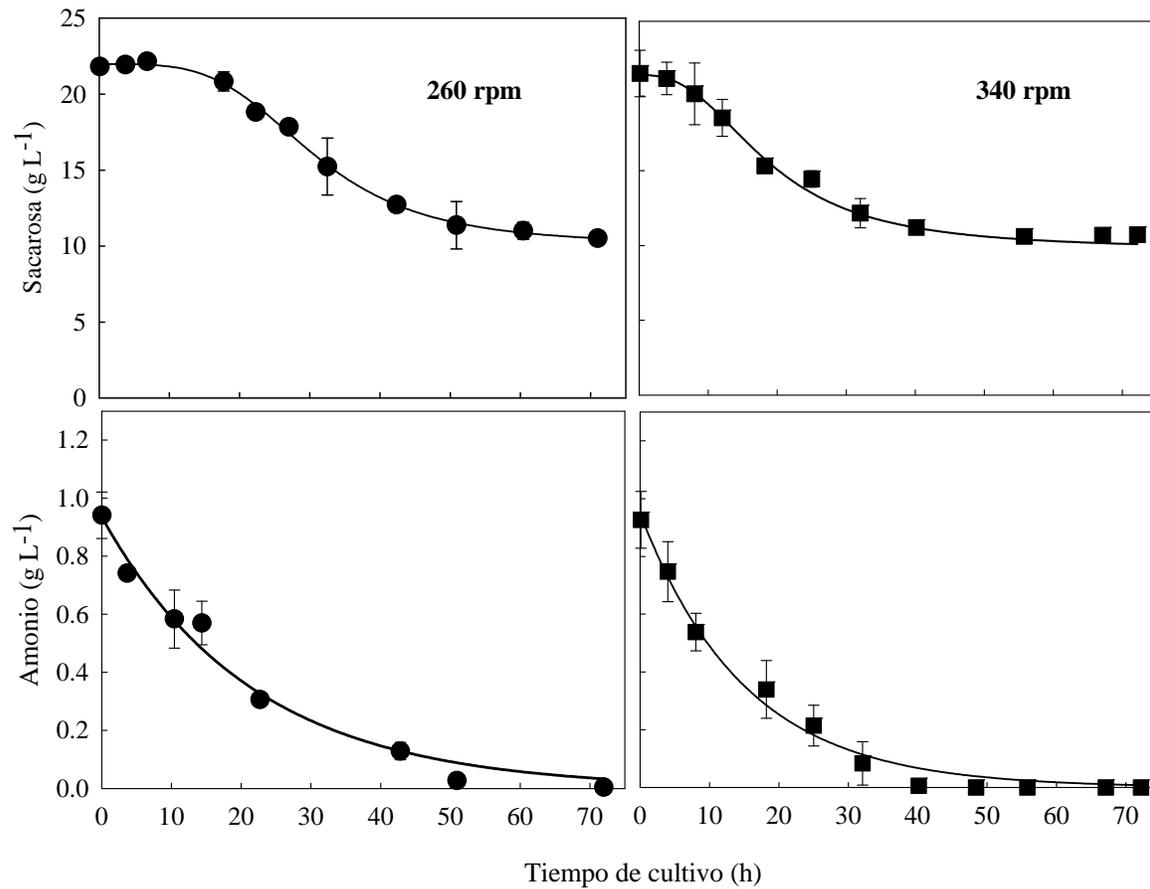
**Figura 6.3.** Relación entre la velocidad de agitación y el  $k_{L,a}$  calculado a partir de la medición de la máxima velocidad de transferencia de oxígeno. El  $k_{L,a}$  fue calculado usando la expresión  $k_{L,a} = VTO_{\max}/C^*_{o_2}$  con  $C^*_{o_2} = 0.2 \text{ mmol L}^{-1}$ .

El  $k_{L,a}$  depende de muchos factores, tales como la geometría del biorreactor, la presencia de microorganismos y las propiedades del medio (por ejemplo, viscosidad). Se sabe que la producción de alginatos incrementa la viscosidad del cultivo, obteniéndose en este trabajo, una viscosidad del caldo que sólo alcanzó 10 mPa s durante el periodo de crecimiento celular. Con el fin de determinar teóricamente la influencia de la viscosidad sobre el  $k_{L,a}$ , se utilizaron correlaciones descritas previamente (García-Ochoa et al. 2000). Aplicando estas correlaciones, se calculó el  $k_{L,a}$  considerando una viscosidad de 1 mPa s (agua) y de 10 mPa s a las diferentes velocidades de agitación estudiadas. Los cálculos indicaron que un aumento de la viscosidad

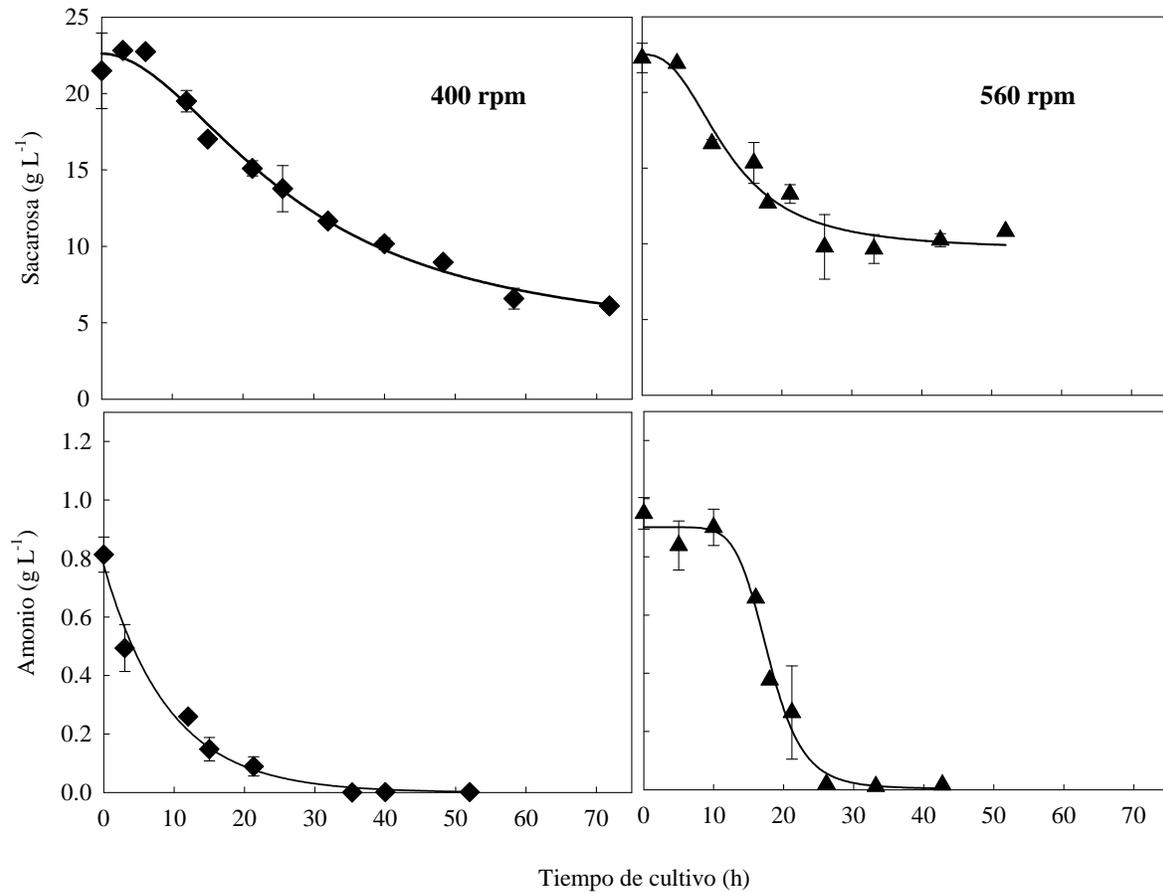
(desde 1 a 10 mPa s) no provocó una disminución importante en el  $k_{La}$  (menos del 5 %). Sin embargo, es importante señalar que la utilización de correlaciones para calcular el  $k_{La}$  es sólo una aproximación, debido a que en muchas ocasiones estas correlaciones son válidas sólo en los rangos de operación establecidos y específicas para el sistema en el que fueron determinadas. Por su parte, las evidencias experimentales muestran que aunque la viscosidad del caldo aumentó durante el crecimiento celular, no disminuyó la velocidad de transferencia de oxígeno del cultivo (Figs 6.1 y 6.2), lo cual es indicativo de que los cambios en la VTO durante el transcurso del cultivo no pueden ser atribuidos a un efecto de la viscosidad del medio.

En los cultivos desarrollados a 260, 340, 450 y 560 rpm, una vez que el microorganismo dejó de crecer, se observó una disminución de la velocidad de transferencia de oxígeno. Esta disminución de la VTO, indica el agotamiento de algún sustrato limitante del crecimiento en biomasa. Las figuras 6.4 y 6.5 muestran la cinética de consumo de sacarosa y amonio en los cultivos realizados a 260, 340, 400 y 560 rpm. En las condiciones estudiadas (incluyendo a 450 rpm, no mostrado), la concentración de sacarosa al final del cultivo (52-72 h, dependiendo del cultivo) fue superior a  $8.5 \text{ g L}^{-1}$ , por lo que otro sustrato fue responsable del cese del crecimiento del microorganismo. Por su parte, el análisis de amonio reveló que su agotamiento coincidió con el cese del crecimiento celular (también en los cultivos a 450 rpm) y la disminución de la VTO, por lo que éste sustrato limitó el crecimiento de biomasa. Sin embargo, aunque el amonio también fue limitante del crecimiento celular en los cultivos realizados a 400 rpm, una vez que se agotó este sustrato no se observó una disminución de la VTO (Fig. 6.2), manteniéndose alrededor de  $2.0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  por más de 20 h durante la fase estacionaria del cultivo. Este valor más alto de la VTO durante la fase estacionaria, puede ser explicado porque en los cultivos llevados a cabo a 400 rpm, el consumo de oxígeno para funciones de

mantenimiento celular fue más elevado (entre 5 y 9 veces, tabla 6.1) que en los otros cultivos, en los cuales la VTO disminuyó durante la fase estacionaria del cultivo.

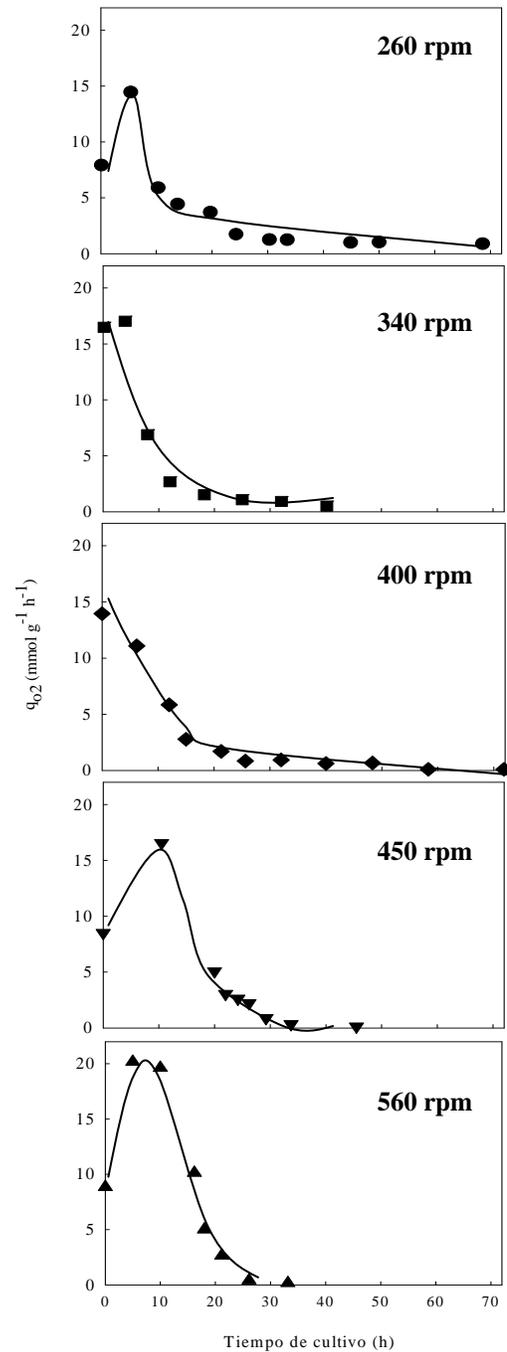


**Figura 6.4.** Cinética de consumo de sacarosa y amonio en cultivos de *A. vinelandii* realizados en biorreactor de 3.0 L bajo diferentes condiciones de agitación. (●) 260 rpm, (■) 340 rpm.



**Figura 6.5.** Cinética de consumo de sacarosa y amonio en cultivos de *A. vinelandii* realizados en biorreactor de 3.0 L bajo diferentes condiciones de agitación. (◆) 400 rpm, (▲) 560 rpm.

A partir de los datos de la  $VTO_{max}$  y la concentración de biomasa, se calculó la velocidad específica de consumo de oxígeno ( $q_{O_2}$ ). En la figura 6.6 se muestra la evolución de la  $q_{O_2}$  durante el transcurso del cultivo a las diferentes velocidades de agitación estudiadas.



**Figura 6.6.** Evolución de la velocidad específica de consumo de oxígeno en cultivos de *A. vinelandii* realizados en biorreactor de 3.0 L bajo diferentes condiciones de agitación. (●) 260 rpm, (■) 340 rpm, (◆) 400 rpm, (▼) 450 rpm, (▲) 560 rpm.

Durante el periodo de crecimiento celular, la  $q_{O_2}$  disminuyó considerablemente, siendo este comportamiento típico de cultivos limitados por oxígeno y descrito previamente en cultivos para la producción de otros polímeros (García-Ochoa et al. 2000; Richard y Margaritis 2003). La velocidad específica de consumo de oxígeno alcanzó su valor máximo antes de las 10 h de cultivo. En ese periodo inicial del cultivo (10 h), la producción de biomasa y el consumo de sacarosa no fueron importantes (Figs. 6.1, 6.2, 6.4, 6.5), no obstante, el acetato, al menos en los cultivos a 340 y 560 rpm (en los cuales fue medido) fue consumido casi totalmente (ver más adelante, Fig. 6.7), lo cual es indicativo de que el incremento de la velocidad específica de consumo de oxígeno, durante la primera etapa del cultivo, fue debido al metabolismo de ese sustrato.

Previamente, en cultivos de *Pichia pastoris*, Charoenrat et al. (2005) utilizaron el concepto de velocidad de respiración relativa (VRR) para establecer el grado de limitación de oxígeno del cultivo. Estos autores definieron la VRR como la velocidad de respiración actual dividida por la máxima velocidad de respiración. Así, cuando más limitado por oxígeno está el cultivo, la velocidad de respiración actual disminuye considerablemente con respecto a la máxima velocidad de respiración y por lo tanto, los cocientes (VRR) son más pequeños. Considerando esta definición, en nuestro trabajo definimos la velocidad de respiración relativa como la  $VTO_{max}$  (equivalente a la VCO cuando la TOD es cero) dividida por la máxima velocidad de consumo de oxígeno (tabla 6.2). En general, los resultados muestran que al disminuir la velocidad de agitación del cultivo (disminuye la VTO) se obtienen VRR menores y por lo tanto el cultivo presenta un mayor grado de limitación de oxígeno. Por ejemplo, durante el crecimiento celular en los cultivos realizados a una velocidad de agitación de 340 rpm ( $VTO = 3.0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) se obtuvo una VRR de 0.134 y en cambio cuando la agitación fue de

560 rpm ( $VTO = 9.0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) la VRR fue de 0.172. Esta es la primera vez que en cultivos de *A. vinelandii* limitados por oxígeno es posible diferenciar entre diferentes grados de limitación de oxígeno, utilizando para ello mediciones de la velocidad de transferencia de oxígeno del cultivo.

## ***6.2. Análisis del proceso comparando la velocidad de consumo de oxígeno y de transferencia de oxígeno***

En el análisis de otros bioprocesos, se ha utilizado el número de Damköhler ( $Da$ ) para establecer cuantitativamente (durante el transcurso del cultivo) si es la velocidad de consumo de oxígeno o es la velocidad de transferencia de oxígeno la limitante del proceso (Calik et al. 2004). El número de Damköhler se define como la máxima velocidad de consumo de oxígeno ( $\mu_{\max} X/Y_{x/o}$ ) entre la máxima velocidad de transferencia de oxígeno ( $VTO_{\max} = k_L a C_{o_2}^*$ ).

Durante el transcurso del cultivo, el valor de ambos componentes ( $\mu X/Y_{x/o}$  y  $VTO_{\max}$ ) varía considerablemente, lo cual determina que paso controla el proceso. Un valor de  $Da$  superior a 1.0 es indicativo de que la etapa limitante del bioproceso es la transferencia de oxígeno al cultivo. En la tabla 6.3 se muestra el número de Damköhler calculado durante el transcurso del cultivo a las diferentes velocidades de agitación estudiadas. En todos los casos analizados, el  $Da$  se incrementó conforme transcurrió el cultivo. Al inicio del cultivo (fase de crecimiento temprana), este parámetro fue menor a 1.0, lo cual es indicativo que la etapa limitante el proceso fue la velocidad de consumo de oxígeno. Por el contrario, durante el crecimiento del

microorganismo, se obtuvieron  $Da > 1.0$ , por lo cual, la transferencia de oxígeno fue la limitante del proceso en ese periodo del cultivo.

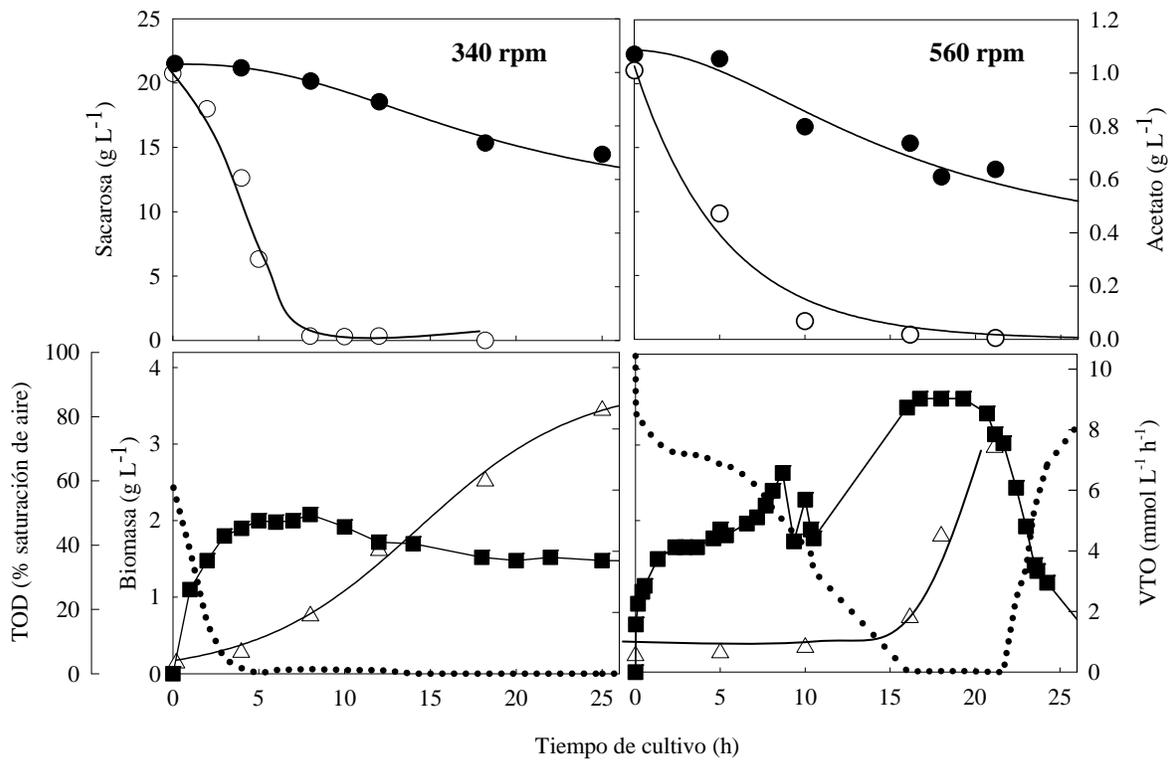
**Tabla 6.3.** Número de Damköhler ( $Da$ ) calculado en cultivos de *A. vinelandii* realizados a diferentes velocidades de agitación.

<i>Velocidad de agitación</i> (rpm)	<i>Tiempo de cultivo</i> (h)	$Da$ ( $\mu_{\max} X/Y_{x/o} / VTO_{\max}$ )
<b>260</b>	5.4	0.6
	24	3.2
	50	5.3
<b>340</b>	0.2	0.3
	18	4.8
	40	6.7
<b>400</b>	6.2	0.5
	15	4.0
	26	7.5
<b>450</b>	10.5	0.4
	22	4.1
	34	6.2
<b>560</b>	5.0	0.3
	21	4.1
	33	5.8

El análisis realizado, permite reforzar la existencia de condiciones de limitación de oxígeno, debido a la transferencia de masa, durante el crecimiento de *A. vinelandii*.

### 6.3. Utilización de la medición en línea de la velocidad de transferencia de oxígeno para evaluar la existencia de crecimiento diáuxico

Se ha descrito que la medición de la velocidad de transferencia de oxígeno es de gran utilidad para describir procesos biológicos como limitación de oxígeno y crecimiento diáuxico (Anderlei y Büchs 2001). Por tal motivo y considerando que en el medio de cultivo se utilizó sacarosa ( $20 \text{ g L}^{-1}$ ) y acetato ( $1.0 \text{ g L}^{-1}$ ), se evaluó la posibilidad de evidenciar el crecimiento diáuxico a través de la medición de la velocidad de transferencia de oxígeno. La figura 6.7 muestra el incremento en la biomasa, la evolución de la TOD y la VTO y el consumo de acetato y sacarosa durante el periodo de crecimiento celular en cultivos realizados a 340 y 560 rpm. Como se puede observar, en ambas condiciones de agitación y entre las 10 y 15 h de cultivo, el acetato se consumió totalmente. En los cultivos realizados a 340 rpm, en las primeras 10 h de cultivo la sacarosa prácticamente no se consumió, por lo que las células de *A. vinelandii* pueden crecer utilizando acetato como única fuente de carbono. Así, el incremento de la VTO hasta  $5.0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (5 h de cultivo) y la disminución de la TOD hasta valores cercanos a cero, se debió principalmente al metabolismo del acetato. En diferentes estudios previos, se ha observado crecimiento diáuxico en cultivos de *A. vinelandii* con glucosa y acetato como fuentes de carbono, siendo el acetato la primera fuente de carbono utilizada por el microorganismo. Este comportamiento puede ser explicado porque el acetato inhibe el sistema de transporte de glucosa (George et al. 1985) o porque el acetato (o sus metabolitos) controla ya sea la expresión o la actividad de enzimas de utilización de la glucosa (Tauchert y Oelze 1990).



**Figura 6.7.** Cinética de producción de biomasa, consumo de sacarosa y acetato, evolución de la TOD y VTO durante el crecimiento celular en cultivos de *A. vinelandii* realizados en biorreactor de 3.0 L a 340 rpm y 560 rpm. (○) acetato, (●) sacarosa, (■) VTO, (Δ) biomasa, (•) TOD. Se muestra el promedio de cada medición.

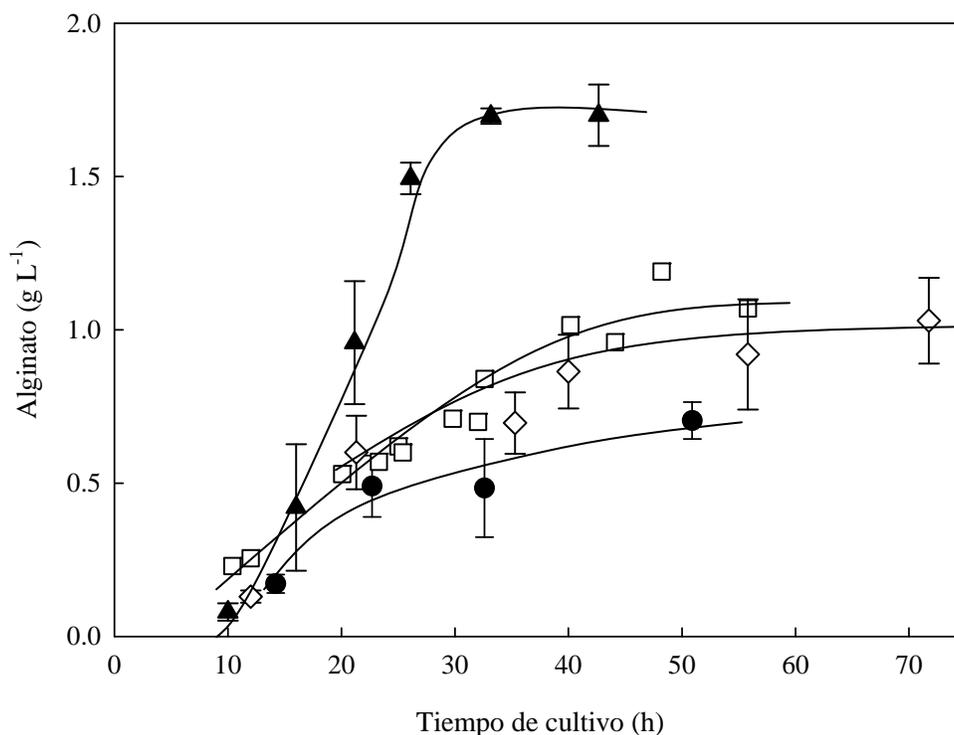
Aunque el análisis de biomasa no permitió establecer la existencia de crecimiento diáuxico, ya que se requiere un monitoreo más continuo de este parámetro, y considerando que en los cultivos a 340 rpm se consumió primero el acetato, es posible que en estos cultivos (a 340 rpm) si exista crecimiento diáuxico.

En cuanto al perfil de la VTO, en los cultivos llevados a cabo a 560 rpm se obtuvieron dos valores máximos de la VTO, lo cual se ha descrito como característico de cultivos con crecimiento diáuxico (Anderlei y Büchs 2001). Por el contrario, en los cultivos realizados a 340 rpm no se observó un perfil de la VTO característico de crecimiento diáuxico (Fig 6.7). Asimismo, en los cultivos a 340 rpm, la limitación de oxígeno se alcanzó antes (5 h) que en los cultivos realizados 560 rpm (15 h). A la luz de estas evidencias, es posible que la caracterización del crecimiento diáuxico en base a la medición de la VTO, sólo podría ser establecida si el cultivo no se encuentra limitado por oxígeno.

#### ***6.4. Influencia de la velocidad de transferencia de oxígeno sobre la producción de alginato y poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB)***

La figura 6.8 muestra la cinética de producción de alginato en cultivos realizados sin control del oxígeno y a diferentes velocidades de agitación (260, 340, 400 y 560 rpm). En todos los casos, la concentración de alginato no superó los  $1.6 \text{ g L}^{-1}$  durante el periodo de cultivo (entre 42 y 72 h dependiendo del caso). En concordancia con estos resultados, Parente et al. (2000) reportaron concentraciones de alginato entre  $1.0$  y  $2.2 \text{ g L}^{-1}$  en cultivos de *A. vinelandii* realizados a diferentes concentraciones de amonio (entre  $0.6$  y  $0.9 \text{ g L}^{-1}$ ) y velocidades de agitación (entre 300 y 700 rpm). En cultivos donde la TOD no fue controlada (Reyes et al. 2003), la concentración de alginato fue tres veces superior a la obtenida en nuestro trabajo. Esta diferencia en la producción de alginato puede ser debida a una diferente razón C/N empleada y/o a la naturaleza de la fuente de nitrógeno utilizada en ambos estudios. Reyes et al. (2003) utilizó extracto de levadura y una razón C/N (en base  $\text{mol mol}^{-1}$ ) de 27 (para este cálculo se consideró un

12 % de nitrógeno en el extracto de levadura), mientras que en nuestro trabajo se usó amonio (en vez de extracto de levadura) y la razón C/N fue de 56. Es sabido que la razón C/N está involucrada en el control de la respiración de *A. vinelandii* (Oelze et al. 2000), por lo que la diferente razón C/N utilizada en ambos trabajos, puede tener influencia sobre la síntesis del alginato y la producción de biomasa.



**Figura 6.8.** Cinética de producción de alginato en cultivos de *A. vinelandii* realizados en biorreactor de 3.0 L bajo diferentes condiciones de agitación. (●) 260 rpm, (□) 340 rpm, (◇) 400 rpm, (▲) 560 rpm.

Por otro lado, la adición de extracto de levadura en el medio favoreció la síntesis de biomasa y es así que en cultivos con extracto de levadura, se obtuvo una concentración de biomasa superior a  $5.0 \text{ g L}^{-1}$  (Reyes et al. 2003), mientras que en nuestro trabajo (con amonio) se

obtuvieron entre 3.0 y 4.0 g L<sup>-1</sup>. Considerando que la mayor cantidad de alginato se obtiene durante la etapa de crecimiento celular, una mayor producción de biomasa podría explicar la más alta concentración de alginato en los cultivos que utilizaron extracto de levadura (Reyes et al. 2003).

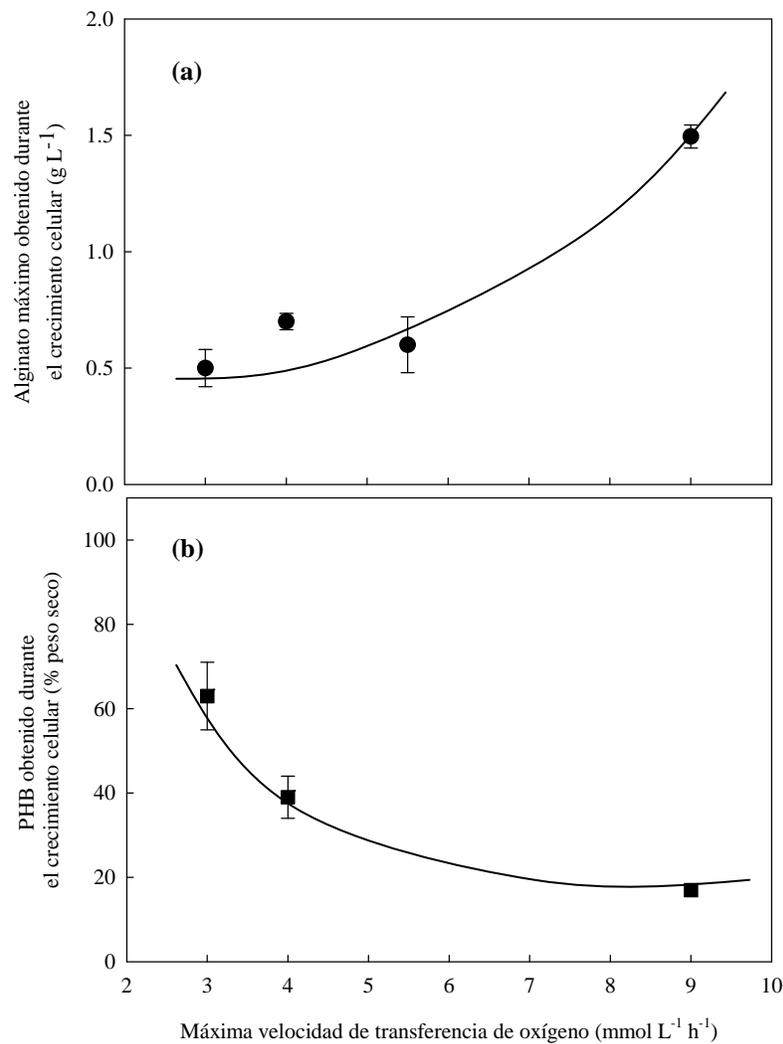
En relación con la cinética de producción de alginato, se sabe que la síntesis de este polímero se encuentra principalmente asociada al crecimiento; sobretodo, si el cultivo es realizado bajo un control estricto de la TOD (Peña et al. 2000). Sin embargo, este comportamiento puede variar si el cultivo es llevado a cabo bajo condiciones no controladas de oxígeno disuelto, como es el caso de matraces o biorreactor sin control de la TOD. En nuestro trabajo, en los cultivos realizados a 260, 340 y 560 rpm, se obtuvo una mayor concentración de alginato asociada al crecimiento celular (sobre un 80 %) y se sintetizó menos alginato una vez que se detuvo el crecimiento celular y disminuyó la velocidad de transferencia de oxígeno. En los cultivos realizados a 400 rpm, alrededor de un 50 % del alginato fue sintetizado durante la fase estacionaria (ver Fig. 6.8, después de las 30 h), cuando la VTO se mantuvo constante cercana a 2.0 mmol L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (Fig. 6.2). Un incremento de la concentración de alginato durante la fase estacionaria ha sido descrito previamente por otros autores (Horan et al. 1981; Parente et al. 1998). Sutherland (1977) propuso que la síntesis de alginato en fase estacionaria podría estar relacionado con un aumento en la disponibilidad de cofactores isoprenoides durante ese periodo, los cuales se sabe son utilizados para la síntesis de peptidoglicanos y lipopolisacáridos durante el crecimiento celular. Sin embargo, la participación de cofactores isoprenoides en la síntesis de alginato no ha sido demostrada. En la literatura existente aún no se ha dado una explicación satisfactoria a qué se debe el incremento de la concentración de alginato en fase estacionaria. Las evidencias de nuestro trabajo, sugieren que un incremento en la concentración de alginato en fase

estacionaria, observado principalmente en los cultivos a 400 rpm, es debido a la influencia de la velocidad de transferencia de oxígeno sobre la biosíntesis del polímero. Un incremento en la concentración de alginato en fase estacionaria cuando la velocidad de transferencia de oxígeno es constante, también ha sido observada en cultivos realizados en matraces (Peña et al. 2007). Un análisis detallado del trabajo de Peña et al. (2007), reveló que se obtuvo un incremento de la concentración de alginato (cerca al 25 %) durante la fase estacionaria, cuando la VTO fue constante y cercana a  $5.0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Una posible explicación a esto es que cuando la velocidad de transferencia de oxígeno (o la velocidad de consumo de oxígeno) es más alta, las células presentarían una mayor actividad de las enzimas involucradas en el ciclo de los ácidos tricarbónicos que permitiría una mayor síntesis de ATP. Se sabe que la síntesis de exopolisacáridos microbianos (incluido el alginato) es un proceso altamente demandante de energía (Jarman y Pace 1984), por lo que en los cultivos llevados a cabo a 400 rpm, durante la fase estacionaria cuando la VTO es elevada, las células tendrían un mayor contenido de ATP que permitiría la biosíntesis de alginato durante esa etapa.

Con el fin de establecer la influencia de la velocidad de transferencia de oxígeno sobre la producción de alginato y PHB cuando existe limitación de oxígeno, se correlacionó la concentración de alginato y la producción de PHB con la  $VTO_{\text{max}}$ . La figura 6.9 muestra la influencia de la  $VTO_{\text{max}}$  sobre la concentración de alginato y PHB obtenidos durante la etapa de crecimiento celular.

En los cultivos realizados a una  $VTO_{\text{max}}$  de  $3.0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (a 260 rpm), se obtuvieron alrededor de  $0.5 \text{ g L}^{-1}$  de alginato después de 23 h de cultivo. Cuando la  $VTO_{\text{max}}$  fue mayor ( $9.0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , a 560 rpm) la producción de alginato se triplicó, llegando a  $1.5 \text{ g L}^{-1}$  luego de

16 h de cultivo. Un incremento en la velocidad de transferencia de oxígeno aumentó la producción de alginato y sólo a una  $VTO_{max}$  de  $5.5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (a 400 rpm) se obtuvo una concentración de alginato similar a la obtenida a una  $VTO_{max}$  de  $4.0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (340 rpm).



**Figura 6.9.** Influencia de la máxima velocidad de transferencia de oxígeno sobre la concentración de alginato (a) y el contenido de PHB (b) obtenidos durante el crecimiento celular en cultivos de *A. vinelandii*.

Posiblemente, esta producción de alginato similar en los cultivos a 340 y 400 rpm, se debe a que en los cultivos a 400 rpm, se obtuvo una mayor producción de alginato (cerca al 50 %) durante la fase estacionaria.

La menor producción de alginato en los cultivos realizados a baja  $VTO_{max}$  y menor velocidad de consumo de oxígeno, podría estar relacionada con la disponibilidad energética de las células. Es conocido el rol de nucleótidos de adenina en la regulación de actividades celulares (Chapman et al. 1971) y considerando que la síntesis de polisacáridos microbianos es altamente demandante de energía, es posible que los niveles celulares de los nucleótidos de adenina (ATP, AMP y ADP) regulados por cambios en la velocidad de consumo de oxígeno (o  $VTO$  durante el crecimiento celular) sean determinantes en la síntesis de alginato.

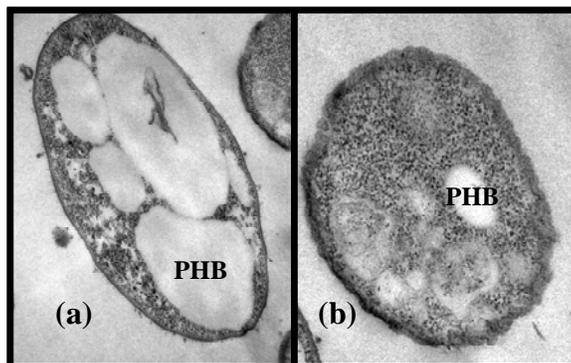
Otra posible explicación a la influencia de la velocidad de transferencia de oxígeno sobre la producción de alginato, podría estar relacionada con un efecto sobre el flujo de carbono en las vías de biosíntesis del polímero. La ruta de biosíntesis de alginato en *A. vinelandii* se ha estudiado desde hace varios años (Pindar y Bucke 1975; Belae y Foster 1986; Anderson et al. 1987). Utilizando glucosa y fructosa marcadas radiactivamente, Anderson et al. (1987) demostraron que la síntesis de alginato desde glucosa es principalmente a partir de productos de degradación de éste carbohidrato (vía Entner-Doudoroff), mientras que el polímero es producido desde fructosa a partir de las hexosas intactas. Considerando que la glucosa y la fructosa son transformadas de manera diferente para la síntesis de alginato (Anderson et al. 1987), es posible que la velocidad de transferencia de oxígeno (velocidad de consumo de oxígeno durante el crecimiento celular) tenga efectos sobre el metabolismo y sobre el flujo de carbono de ambos carbohidratos, lo cual tendría influencia directa sobre la producción de alginato.

Se ha establecido que la etapa limitante y el punto de control en la biosíntesis de alginato es la actividad AlgD, la cual está involucrada en la oxidación irreversible de GDP-manurónico (Tatnell et al. 1994). En esta línea, se han realizado algunos estudios acerca de la influencia de la TOD sobre la actividad de algunas enzimas involucradas en la síntesis de alginato tanto en *P. aeruginosa* (Leitão y Sá-Corriea 1993) como en *A. vinelandii* (Horan et al. 1981; Horan et al. 1983). Horan et al. (1983) demostraron, en cultivo continuo de *A. vinelandii*, que un aumento en la TOD desde 0 a 10 % incrementó la velocidad específica de consumo de oxígeno, la velocidad de síntesis de alginato y la actividad de las enzimas fosfomanosa isomerasa y GDP-manosa pirofosforilasa. De estos resultados es posible deducir (aunque los autores no hacen mención), que existe una relación entre la velocidad de consumo de oxígeno y la actividad de algunas enzimas de la ruta de biosíntesis de alginato o la expresión de los genes involucrados. En este mismo sentido, Leitão y Sá-Corriea (1993), demostraron en cultivos de *P. aeruginosa*, que la actividad GDP-manosa deshidrogenasa (gen *algD*) es dependiente de la TOD entre 0 y 10 % y que ésta se incrementa con el nivel de oxígeno disuelto. A la luz de estas evidencias, es posible que en nuestro caso, un incremento en la concentración de alginato, debido a una mayor velocidad de transferencia de oxígeno (Fig. 6.9a), esté relacionado con una actividad más alta de las enzimas claves de la ruta de biosíntesis o una mayor expresión de los genes que las codifican, de manera similar como fue previamente reportada la influencia de la TOD en cultivo continuo (Horan et al. 1983) y en cultivo por lote (Horan et al. 1981).

En estudios con *A. vinelandii* bajo condiciones de fijación de nitrógeno (Sabra et al. 2000) o en cultivos bajo condiciones que previenen la fijación de nitrógeno (Parente et al. 1998; Peña et al. 2000), se ha indicado que la producción de alginato es fuertemente influenciada por la TOD y la velocidad de agitación del cultivo. Peña et al. (2000) demostraron que la bacteria produce más

alginato ( $4.5 \text{ g L}^{-1}$ ) a una TOD de 5 % que cuando la TOD es menor (1 %), el cual sólo alcanzó  $1.0 \text{ g L}^{-1}$ . Sabra et al. (2000) reportaron que la velocidad específica de consumo de oxígeno y de producción de alginato se incrementaron con un aumento de la TOD entre 1 y 5 %. Así, un aumento de la TOD y por tanto de la velocidad de consumo de oxígeno, favorecen la síntesis de alginato. Los resultados de nuestro trabajo están en la misma línea que esta observación, ya que a mayores VTO (o velocidades de consumo de oxígeno), se obtuvieron concentraciones más altas de alginato durante el crecimiento celular. En este sentido, el principal aporte de nuestro trabajo es que por primera vez, se ha establecido una relación directa entre la velocidad de consumo de oxígeno y la producción de alginato durante el crecimiento celular bajo condiciones de limitación de oxígeno, utilizando para ello mediciones en línea de la velocidad de transferencia de oxígeno.

Como lo muestra la figura 6.9, una disminución de la concentración de alginato (a baja  $\text{VTO}_{\text{max}}$ ) fue relacionada con un incremento en la producción de PHB. A una más baja  $\text{VTO}_{\text{max}}$  ( $3.0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ), se incrementó la producción de PHB, llegando hasta un 63 % del peso seco de las células, lo cual representa una desviación del flujo del metabolismo de carbohidratos hacia la síntesis de este polímero en desmedro de la producción de alginato. Utilizando microscopía electrónica, se registraron células cultivadas a 560 y 260 rpm (Fotografía 6.1) y se evidenció el más elevado contenido de PHB (63 %) presente en esas células crecidas a 260 rpm.



**Fotografía 6.1.** Microfotografías electrónicas de células de *A. vinelandii* con diferente contenido de PHB. Cultivos realizados a una velocidad de transferencia de oxígeno de (a)  $3.0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (260 rpm), (b)  $9.0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (560 rpm).

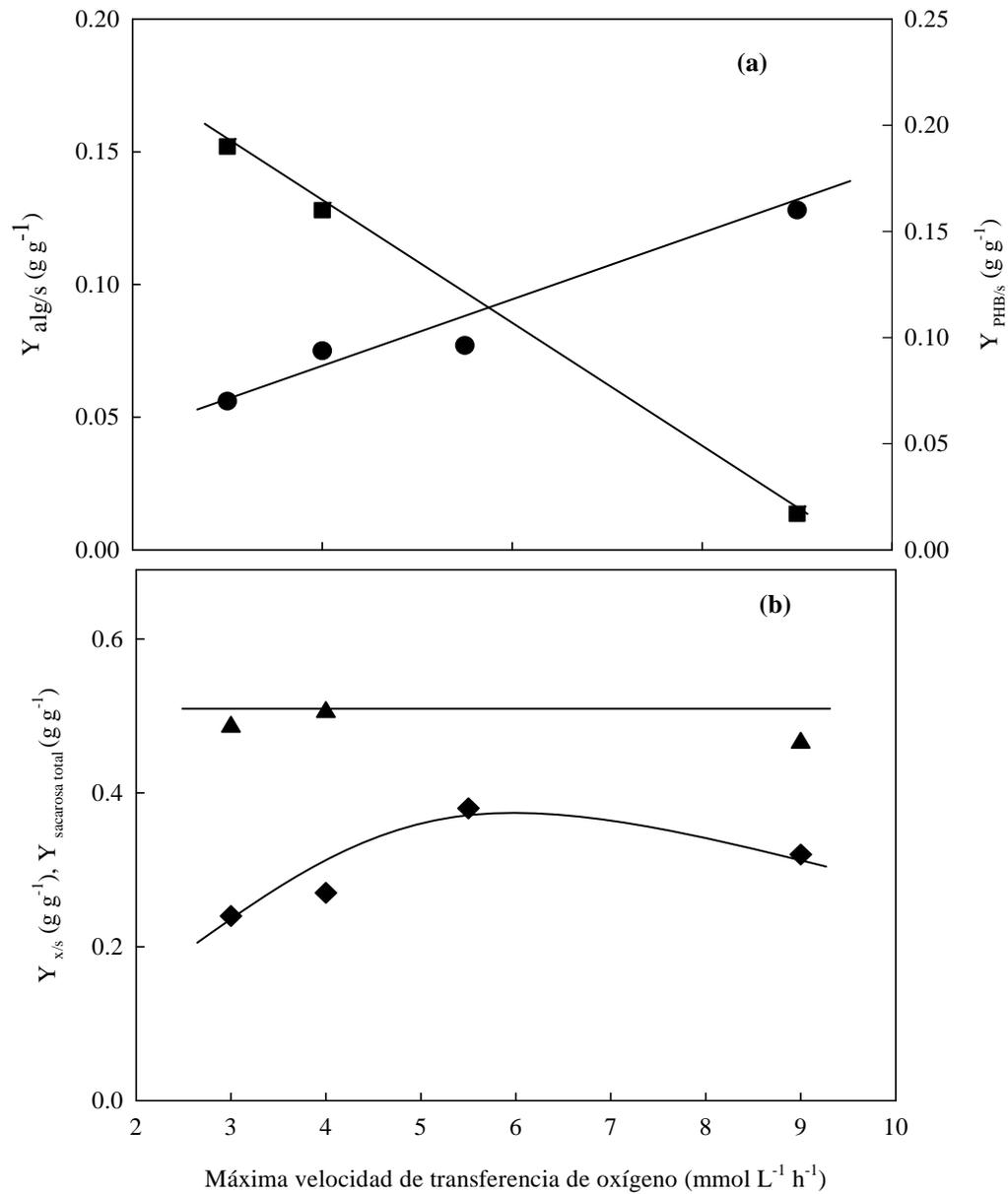
Es sabido que bacterias del género *Azotobacter* pueden acumular grandes cantidades de PHB bajo condiciones de limitación de oxígeno (Senior y Dawes 1973; Brivonese y Sutherland 1989; Page et al. 2001). En condiciones de limitación de oxígeno, la razón  $\text{NAD(P)H/NAD(P)}^+$  se incrementa y se inhibe la actividad de algunas enzimas del ciclo TCA, lo cual puede disminuir la velocidad de metabolización del acetyl-CoA, por lo que una mayor cantidad de acetyl-CoA puede ser reducida a  $\beta$ -bihidroxibutiril-CoA para ser polimerizado a PHB, con una consiguiente reoxidación del  $\text{NAD(P)H}$  (Senior y Dawes 1973). Este cambio en la actividad metabólica bajo condiciones de limitación de oxígeno, podría afectar el flujo intracelular de carbono con una disminución en la producción de alginato y un aumento en el contenido de PHB.

Con el propósito de establecer una base de análisis comparativa, se evaluó la influencia de  $\text{VTO}_{\text{max}}$  sobre el rendimiento de sacarosa en alginato, PHB y biomasa (figura 6.10). En la figura

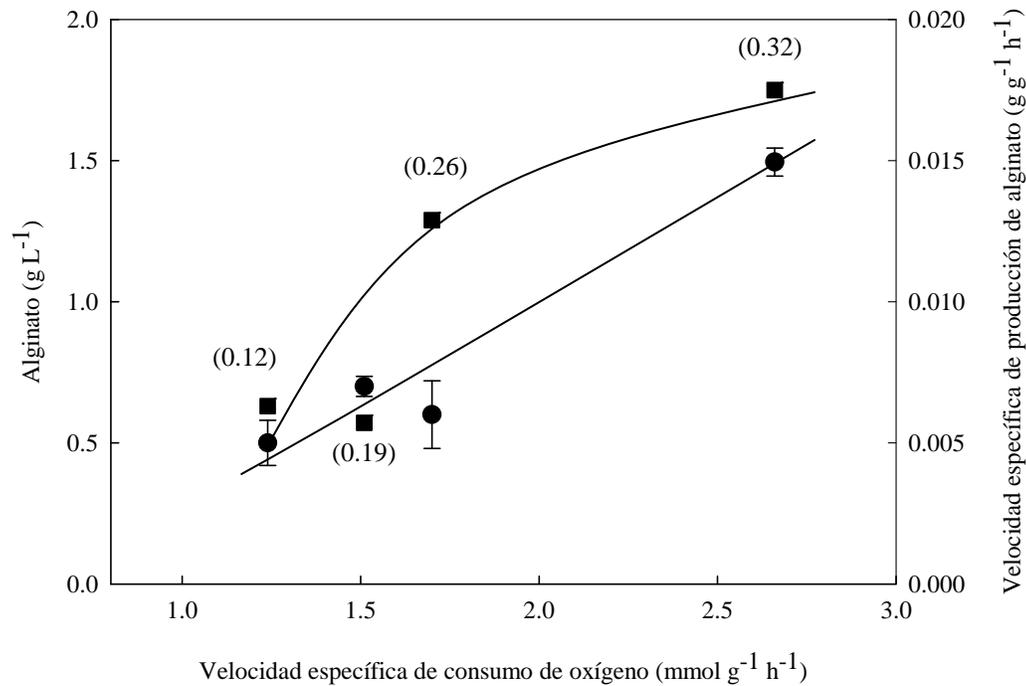
6.10 se muestra que un aumento de la  $VTO_{max}$  (hasta  $5.5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) del cultivo incrementó el rendimiento de sacarosa en biomasa ( $Y_{x/s}$ ). Un incremento en la velocidad de transferencia de oxígeno, afectó de manera contraria el rendimiento de la fuente de carbono en alginato ( $Y_{alginato/s}$ ) y en PHB ( $Y_{PHB/s}$ ) (Fig. 6.10a). Al aumentar la  $VTO_{max}$  desde  $3.0$  a  $9.0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  disminuyó once veces el  $Y_{PHB/s}$  y se incrementó al doble el  $Y_{alginato/s}$ . Asimismo, el rendimiento total de sacarosa, es decir, la sumatoria de los rendimientos  $Y_{alginato/s}$ ,  $Y_{PHB/s}$  y  $Y_{x/s}$  fue relativamente constante, cercano a  $0.5 \text{ g g}^{-1}$ . Los resultados demuestran que la distribución de carbono entre los polímeros (alginato y PHB) fue afectada por la velocidad de transferencia de oxígeno.

Debido a que el PHB y el alginato son dos polímeros que compiten por la fuente de carbono, si el objetivo es incrementar la producción de alginato, los resultados de este trabajo indican que sería de gran utilidad establecer un determinado nivel de la VTO para maximizar un polímero respecto del otro. Asimismo, si el rendimiento de alginato fuera crítico (y no el peso molecular), un incremento en la VTO permitiría un considerable aumento en el rendimiento de sacarosa en alginato.

Un aspecto menos estudiado relacionado con la producción de alginato, es la influencia que tiene la velocidad específica de consumo de oxígeno sobre la síntesis del polímero. En la figura 6.11 se muestra la influencia de la velocidad específica de consumo de oxígeno ( $q_{o_2}$ ) (se incluye entre paréntesis el valor de la velocidad específica de crecimiento) sobre la concentración de alginato y la velocidad específica de producción de alginato ( $q_{alg}$ ).



**Figura 6.10.** Influencia de la máxima velocidad de transferencia de oxígeno sobre el (a) rendimiento de sacarosa en alginato y PHB y (b) el rendimiento celular y total de sacarosa en cultivos de *A. vinelandii* limitados por oxígeno. (●)  $Y_{\text{alginato/s}}$ , (■)  $Y_{\text{PHB/s}}$ , (◆)  $Y_{\text{x/s}}$ , (▲)  $Y_{\text{total sacarosa}}$ .



**Figura 6.11.** Efecto de la velocidad específica de consumo de oxígeno sobre la concentración de alginato y la velocidad específica de producción de alginato ( $q_p$ ) en cultivos de *A. vinelandii* limitados por oxígeno. (●) alginato, (■) ( $q_p$ ). Entre paréntesis se indica la velocidad específica de crecimiento ( $\text{h}^{-1}$ ).

Con excepción de los cultivos realizados a 400 rpm ( $q_{O_2} = 1.7 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ), la concentración de alginato durante el crecimiento celular (cuando existe limitación por oxígeno) se incrementó al aumentar la velocidad específica de consumo de oxígeno. La no dependencia entre  $q_{O_2}$  y la síntesis de alginato obtenida en los cultivos realizados a 400 rpm, puede ser explicada porque en esas condiciones, la mayor concentración del polímero (~ 50 %) se obtuvo en fase estacionaria.

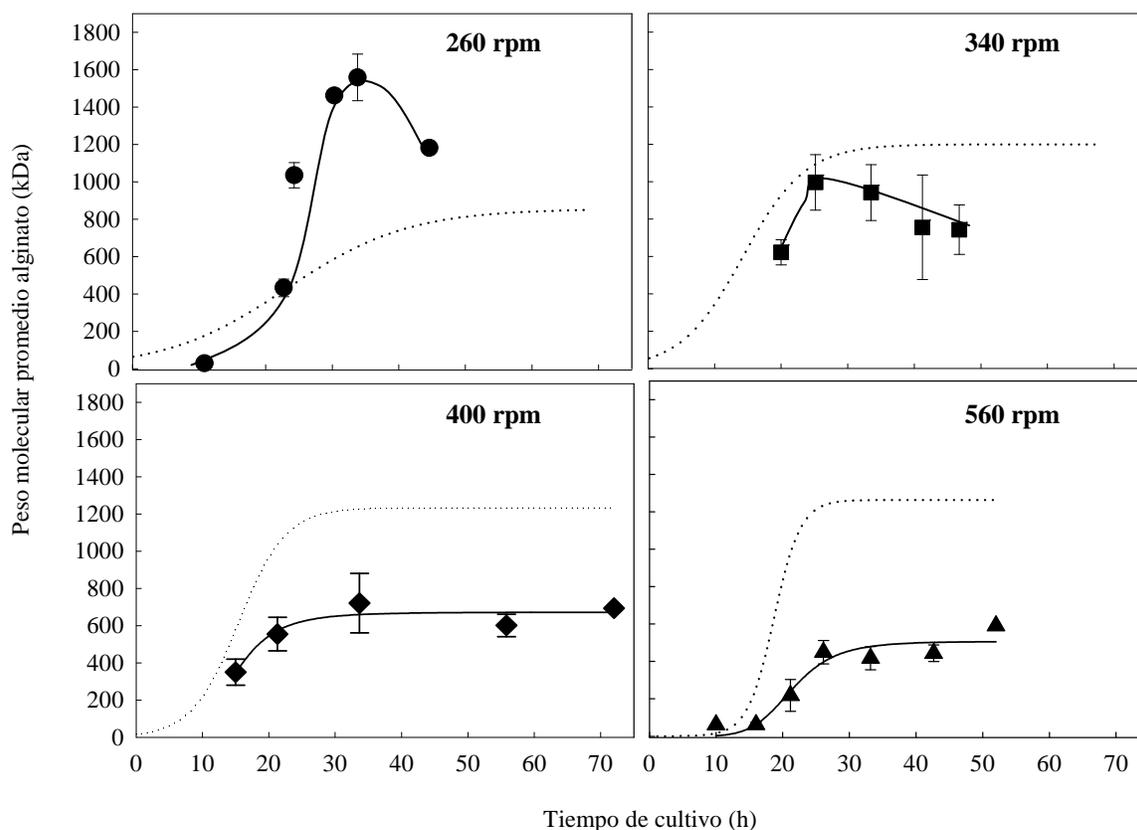
A velocidades específicas de oxígeno superiores a  $1.5 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  se observó un importante aumento en la velocidad específica de producción de alginato, la cual se incrementó desde  $0.006 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  hasta  $0.018 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  cuando la  $q_{o_2}$  fue de  $2.7 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Asimismo, un aumento en la concentración de alginato y en la  $q_{alg}$  fue correlacionado con un incremento en la velocidad específica de crecimiento (valores mostrados entre paréntesis, Fig. 6.11). Resultados similares fueron reportados por Parente et al. (1998) y Mian et al. (1978), tanto en cultivos de *A. vinelandii* y de *P. aeruginosa*, respectivamente. En un sentido opuesto, Jarman et al. (1978) determinaron en un cultivo continuo de *A. vinelandii* que la velocidad de síntesis de alginato es independiente de la velocidad de crecimiento, sugiriendo que la competencia entre la síntesis de exopolisacáridos y los componentes de la pared celular no es influenciada por la velocidad de síntesis del exopolisacárido.

En estudios realizados por Deavin et al. (1977) y Jarman et al. (1978) en cultivo continuo de *A. vinelandii* limitado por fosfato, se evaluó la influencia de la velocidad específica de consumo de oxígeno entre 5 y  $35 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (manipulada por cambios en la velocidad de agitación) sobre la producción de polisacárido extracelular. A una velocidad de dilución constante de  $0.15 \text{ h}^{-1}$ , estos autores indicaron que la concentración de polisacárido extracelular no varió con cambios en la velocidad específica de consumo de oxígeno. Esta independencia entre la velocidad específica de consumo de oxígeno y la concentración de polisacárido es contraria con los resultados obtenidos en nuestro trabajo (Fig. 6.11). Sin embargo, un análisis más detallado de los resultados reportados por Deavin et al. (1977), muestra que a bajas velocidades específicas de consumo de oxígeno ( $< 12 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ), existe una disminución de la concentración de polisacárido extracelular (desde  $1.0$  a  $0.6 \text{ g L}^{-1}$ ) a medida que disminuye la  $q_{o_2}$  (desde  $12$  a  $5 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ). Este comportamiento es similar a nuestras evidencias, ya que al disminuir la

velocidad específica de consumo de oxígeno en un rango de bajas  $q_{O_2}$  (como las estudiadas en este trabajo, entre 1.2 y 2.7  $\text{mmol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ ), se observó una disminución de la concentración de alginato desde 1.5 a 0.5  $\text{g L}^{-1}$  (Fig. 6.11).

### **6.5. Influencia de la velocidad de transferencia de oxígeno sobre el peso molecular del alginato**

En la figura 6.12 se muestra la evolución del peso molecular promedio (PMP) del alginato en cultivos realizados a diferentes condiciones de transferencia de oxígeno. Es interesante destacar que durante el crecimiento de *A. vinelandii*, la VTO se mantuvo prácticamente constante y el peso molecular del alginato varió considerablemente, en especial en los cultivos realizados a una velocidad de agitación de 260 rpm. Este incremento del PMP durante el desarrollo del cultivo ha sido descrito previamente en cultivos de *A. vinelandii* con control de oxígeno disuelto (3 %) y a 300 rpm (Trujillo-Roldán et al. 2003a). Por el contrario, Trujillo-Roldán et al. (2004) en cultivos con control de la TOD (3 %) y a 700 rpm, demostraron que el peso molecular del alginato fue similar durante todo el desarrollo del cultivo. Estas diferencias en la evolución del peso molecular del alginato pueden ser atribuidas a las condiciones del inóculo, ya que a diferencia de lo realizado por Trujillo-Roldán et al. (2004), en nuestro trabajo y en el de Trujillo-Roldán et al. (2003a), el inóculo no fue lavado y se adicionó completamente al biorreactor. En este sentido, se sabe que los componentes del inóculo (alginato y/o otros componentes) juegan un papel importante en la cinética y distribución del peso molecular del alginato producido por *A. vinelandii* (Trujillo-Roldán et al. 2003b).



**Figura 6.12.** Evolución del peso molecular promedio del alginato sintetizado en cultivos de *A. vinelandii* realizados en biorreactor de 3.0 L bajo diferentes condiciones de agitación. (●) 260 rpm, (■) 340 rpm, (◆) 400 rpm, (▲) 560 rpm. En línea punteada se muestra la cinética de crecimiento celular (reproducida a partir de los puntos experimentales de las Figs. 6.1 y 6.2).

En los cultivos realizados a una  $VTO_{max}$  de 3.0 y de 4.0  $mmol L^{-1} h^{-1}$  (260 y 340 rpm, respectivamente) se observó una disminución del peso molecular promedio del alginato después de 30 h de cultivo (Fig. 6.12). Sin embargo, en cultivos llevados a cabo a  $VTO_{max}$  de 5.5 y 9.0  $mmol L^{-1} h^{-1}$  (400 y 560 rpm respectivamente) no se observó una disminución del PMP.

Previamente, Parente et al. (2000) en cultivos de *A. vinelandii* realizados a velocidades de agitación superiores a 500 rpm, indicaron que la depolimerización (disminución del peso molecular) del alginato fue considerablemente menor que cuando el cultivo fue realizado a velocidades de agitación menores (300 rpm), lo cual está de acuerdo con lo obtenido en nuestro trabajo. Parente et al. (2000) indicaron que la depolimerización del alginato no fue correlacionada con el agotamiento de amonio, la velocidad específica de crecimiento ni la tensión de oxígeno disuelto, sino que más bien existió una fuerte relación entre la depolimerización y la velocidad de agitación; a mayor velocidad de agitación menor depolimerización del alginato. Estos autores sugirieron una posible influencia de la velocidad de transferencia de oxígeno sobre la producción de alginato, pero no midieron este parámetro en sus experimentos.

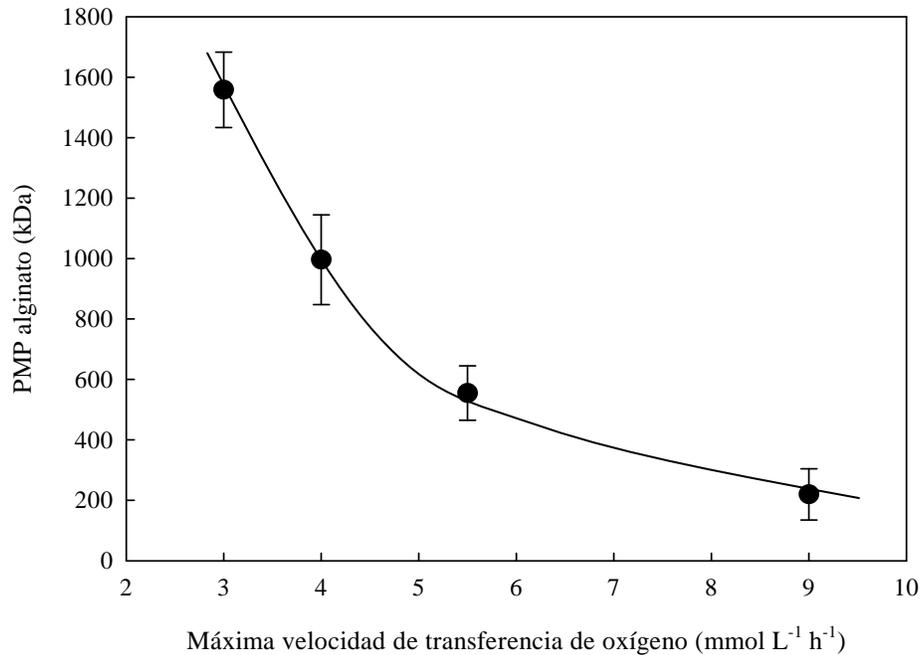
Sabra et al. (1999) indicaron que la depolimerización del alginato se encuentra relacionada con el agotamiento de fosfato del medio de cultivo. En nuestro trabajo, se utilizaron niveles iniciales de fosfato entre 4 y 8 veces superior a los empleados por Sabra et al. (1999), siendo esta concentración de fosfato (cerca a  $0.8 \text{ g L}^{-1}$ ) reportada previamente como no limitante del crecimiento celular (Parente et al. 2000). Esto indicaría que la disminución del peso molecular en los cultivos a 260 y 340 rpm no estaría relacionada con el agotamiento del fosfato. Es ampliamente sabido que la actividad alginato liasa es responsable de la depolimerización del alginato (Kennedy et al. 1992; Wong et al. 2000; Trujillo-Roldán et al. 2004) y recientemente en *P. fluorescens* se ha sugerido que la acción biológica de las alginato liasas (gen *algL*) es degradar el alginato en el espacio periplásmico para evitar su acumulación y un efecto tóxico sobre las células (Bakkevig et al. 2005). A la luz de nuestras evidencias, parece más razonable que la depolimerización del alginato esté controlada por la velocidad de transferencia de oxígeno y no por el agotamiento de algún nutriente. Es posible que la velocidad de transferencia de oxígeno

determine la actividad y/o expresión de las enzimas alginato liasas, responsables de editar el tamaño del alginato.

Para determinar el efecto de la velocidad de transferencia de oxígeno sobre el peso molecular del alginato sintetizado en el periodo de limitación de oxígeno (cuando la  $VTO_{max}$  es constante), se correlacionó el peso molecular promedio del alginato con la  $VTO_{max}$  del cultivo. En la figura 6.13 se muestra la influencia de la máxima VTO sobre el peso molecular del alginato sintetizado durante el crecimiento celular.

El peso molecular promedio del alginato obtenido en la etapa de crecimiento celular (bajo limitación de oxígeno) fue más alto cuando el cultivo se llevó a cabo a una menor velocidad de transferencia de oxígeno. En cultivos llevados a cabo a una  $VTO_{max}$  de  $3.0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , el peso molecular (a las 31 h de cultivo) fue 7.0 veces más alto (1560 kDa) comparado con el sintetizado a una  $VTO_{max}$  de  $9.0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , el cual fue de 220 kDa (a las 21 h de cultivo). Esta evidencia muestra la influencia de la VTO sobre el peso molecular del alginato sintetizado durante la etapa de limitación de oxígeno. Estos resultados, constituyen la base fundamental del artículo publicado en la revista *Applied Microbiology Biotechnology* (2007) 76: 903–910 (anexo A).

Esta es la primera vez que se establece la influencia de la VTO sobre el peso molecular del alginato sintetizado por *A. vinelandii*. Por lo expuesto, nuestro estudio muestra la utilidad de estimar la VTO durante el crecimiento celular, estableciendo su influencia sobre el peso molecular del alginato bajo condiciones (TOD cercana a cero) donde la TOD (continuamente utilizada en otros estudios) no puede ser usada como parámetro.



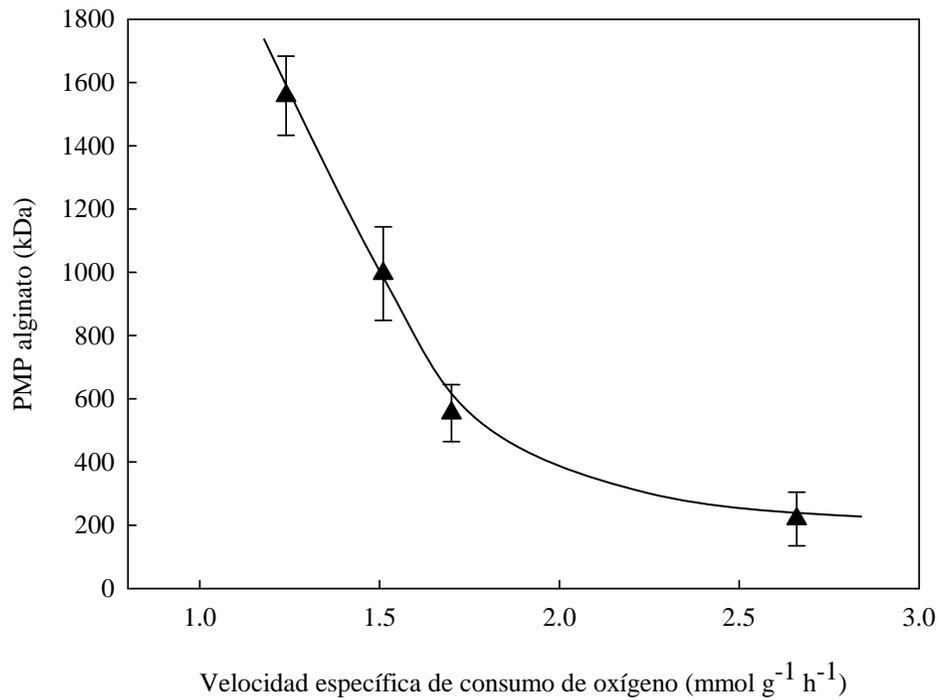
**Figura 6.13.** Influencia de la máxima velocidad de transferencia de oxígeno sobre el máximo peso molecular promedio (PMP) del alginato obtenido bajo condiciones de limitación de oxígeno en cultivos de *A. vinelandii* realizados en biorreactor de 3.0 L.

En la literatura existe un número limitado de estudios acerca de la influencia de la velocidad de agitación sobre el peso molecular del alginato sintetizado por *A. vinelandii* (Peña et al. 2000; Parente et al. 2000). Peña et al. (2000) realizaron estudios a velocidades de agitación de 300 y 700 rpm en cultivos a una TOD constante de 3 % y obtuvieron pesos moleculares más altos (680 kDa) a una velocidad de agitación de 300 rpm en comparación a los cultivos llevados a cabo a 700 rpm, en los cuales el PMP fue de 352 kDa. Estas evidencias son similares a las obtenidas en nuestro trabajo, ya que el PMP se incrementó considerablemente a menores  $VTO_{max}$ , es decir, a más bajas velocidades de agitación. Una explicación a este comportamiento fue descrita por Peña

et al. (2000), quienes indicaron que la presencia de agregados celulares en los cultivos realizados a 300 rpm son determinantes en el aumento del peso molecular, debido a una posible limitación difusional de oxígeno. Sin embargo, en nuestro trabajo esta explicación no es válida, ya que en los cultivos realizados a 260 y 340 rpm en los cuales el PMP fue más alto, no se observó una cantidad importante de agregados celulares.

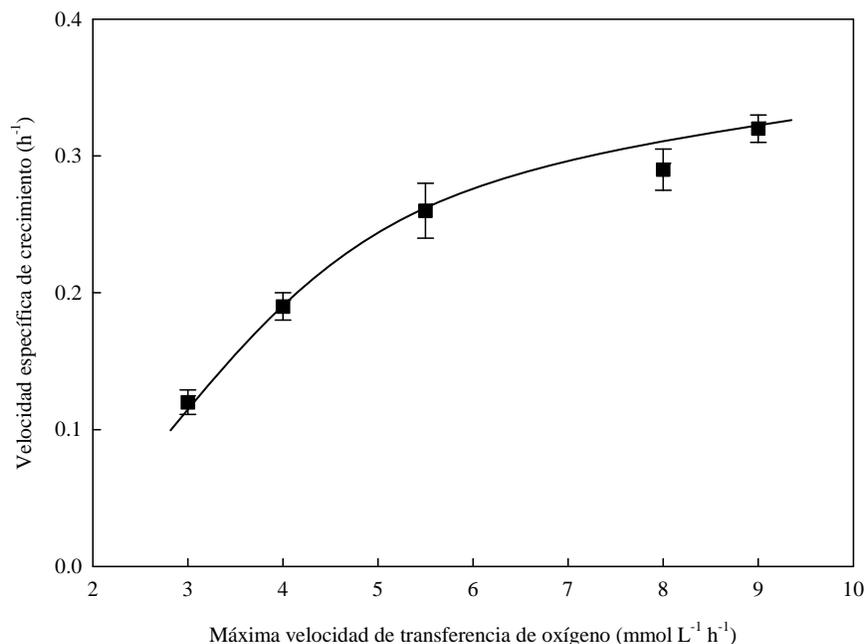
En relación con la influencia de la velocidad específica de consumo de oxígeno sobre el peso molecular del alginato, en la figura 6.14 se observa que, de manera semejante al efecto de la  $VTO_{max}$  (Fig. 6.13), un mayor PMP del alginato se obtuvo a velocidades específicas de consumo de oxígeno más bajas. Sabra et al. (2000), usando un cultivo continuo limitado por fosfato bajo condiciones de fijación de nitrógeno, reportaron que el peso molecular del alginato y el contenido de ácido gulurónico se incrementan con un aumento de la velocidad específica de consumo de oxígeno, alcanzándose un peso molecular de 800 kDa y un contenido de gulurónico de 50 % en los cultivos realizados a una TOD de 10 %. Estos autores propusieron que bajo condiciones de fijación de nitrógeno, la bacteria sintetiza una cápsula de alginato que protege el sistema nitrogenasa contra el daño por oxígeno. Claramente, los resultados de nuestro trabajo que muestran una disminución del peso molecular del alginato al incrementarse la velocidad específica de consumo de oxígeno (Fig. 6.14) son contrarios a lo observado por Sabra et al. (2000). Esta diferente influencia de la velocidad específica de consumo de oxígeno sobre el peso molecular del alginato obtenida en este trabajo y por Sabra et al. (2000), puede ser explicada porque estos autores trabajaron en cultivos a una TOD constante entre 1 y 10 % y en cambio, en nuestro estudio, los cultivos se realizaron en una región de TOD cercana a 0 % (entre 0 y 1 %). Asimismo, a diferencia de nuestro trabajo, Sabra et al. (2000) cultivaron la bacteria en

condiciones de fijación de nitrógeno, lo cual se sabe tiene efectos importantes sobre el metabolismo respiratorio de *A. vinelandii* y la síntesis de alginato.



**Figura 6.14.** Efecto de la velocidad específica de consumo de oxígeno sobre el peso molecular promedio máximo del alginato obtenido bajo condiciones de limitación de oxígeno en cultivos de *A. vinelandii* realizados en biorreactor de 3.0 L.

Es sabido que la velocidad de transferencia de oxígeno afecta la velocidad específica de crecimiento celular ( $\mu$ ). Como era de esperar, un incremento en la VTO provocó un aumento de la  $\mu$  (figura 6.15).



**Figura 6.15.** Efecto de la máxima velocidad de transferencia de oxígeno sobre la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) en cultivos de *A. vinelandii* realizados en biorreactor de 3.0 L.

Esta evidencia puede ser explicada considerando que a más bajas velocidades de transferencia de oxígeno y por tanto menor velocidad de consumo de oxígeno, las células presentan un ciclo de ácidos tricarboxílicos menos activo, disminuyendo la formación de ATP y por ende la velocidad de crecimiento del microorganismo. En esta línea, un factor que ha sido recientemente indicado como determinante en el peso molecular del alginato sintetizado por *A. vinelandii* es la velocidad específica de crecimiento (Reyes 2003; Priego-Jiménez et al. 2005). Utilizando diferentes estrategias de cultivo, estos autores han establecido que la velocidad específica de crecimiento determina el peso molecular del alginato. Previamente, Priego-Jiménez

et al. (2005), en cultivos por lote alimentado limitado por carbono, demostraron que una disminución de  $\mu$  provocó un aumento en el peso molecular del alginato, lo cual es similar a lo obtenido en nuestro trabajo, ya que a más bajas VTO y por lo tanto más bajas  $\mu$ , el peso molecular del alginato fue mayor. Considerando esto, la influencia de la VTO sobre el peso molecular del alginato podría ser explicada en términos de cambios en la velocidad específica de crecimiento.

En concordancia con nuestros resultados, Leitão et al. (1992), manipulando la velocidad específica de crecimiento por cambios de la temperatura del cultivo de *P. aeruginosa*, obtuvieron alginatos de mayor peso molecular cuando la temperatura de crecimiento (25° C) y la  $\mu$  fueron más bajas. Una hipótesis que podría explicar la influencia de  $\mu$  sobre el peso molecular del alginato, está relacionada con la competencia entre los constituyentes para la síntesis de la pared celular y del alginato (Sutherland 1977). Así, una limitada disponibilidad de constituyentes para la síntesis de pared celular y de alginato, principalmente cuando el microorganismo crece a más altas  $\mu$ , podría determinar la liberación de polímeros de alginato de cadena corta.

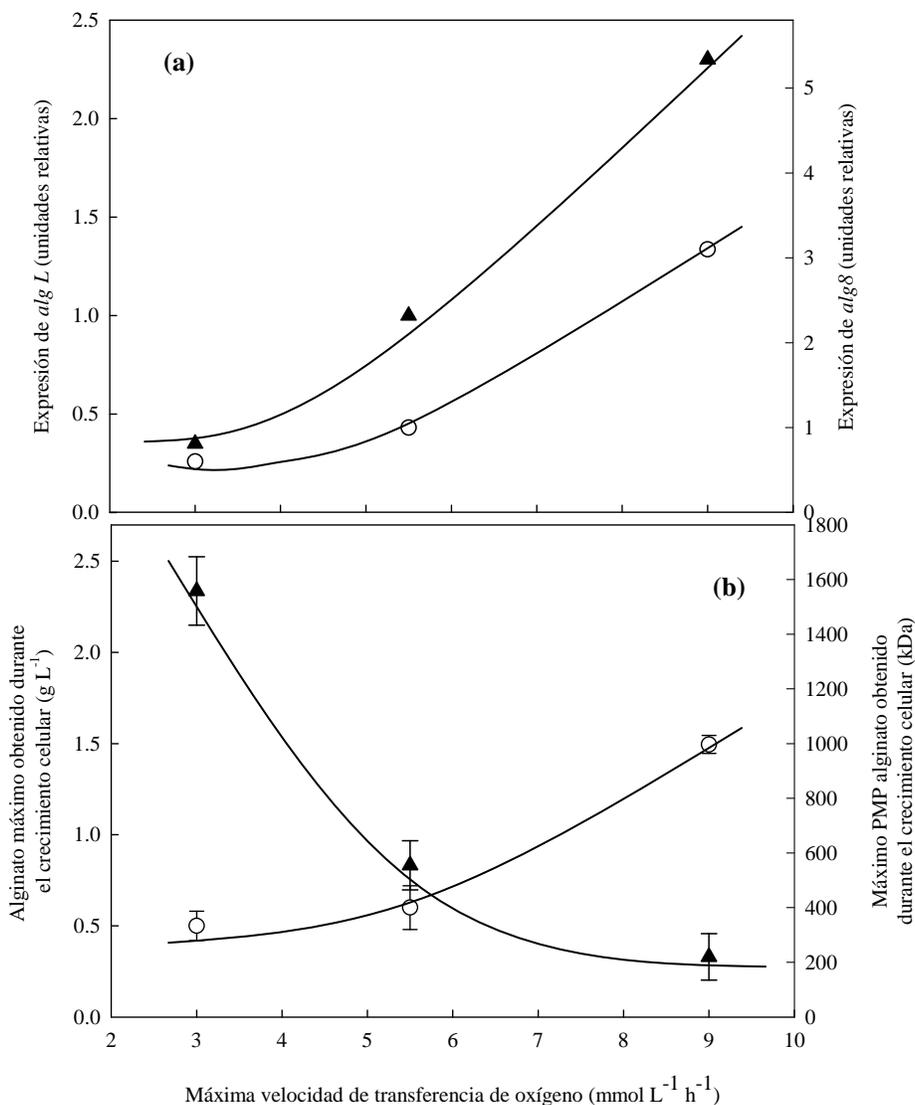
Previamente, se ha determinado que la velocidad de agitación tiene efectos importantes sobre la polimerización (incremento del peso molecular) y depolimerización del alginato (Parente et al. 1998; Parente et al. 2000). Estos autores, que llevaron a cabo cultivos sin control de la TOD, indicaron que a más altas velocidades de agitación (entre 600 y 700 rpm) se sintetizan al inicio de la fase estacionaria o durante éste periodo, alginatos de mayor peso molecular. Sin embargo, un análisis detallado de sus resultados, revela que un más alto peso molecular del alginato sintetizado durante la fase de crecimiento celular, se encuentra relacionado con una

menor velocidad específica de crecimiento, lo cual está en el mismo sentido de los resultados de nuestro trabajo.

### ***6.6. Expresión de algL y alg8 en cultivos realizados a diferentes velocidades de transferencia de oxígeno***

Algunos estudios en *P. aeruginosa* han demostrado que la expresión de genes como *algA* o *algD* (Leitão y Sá-Corriea 1993) y *alg8* (Remminghorst y Rehm 2006b) son determinantes en la producción de alginato y que la transcripción de los genes *algA*, *algC*, *algD* y la actividad de las enzimas de la ruta de biosíntesis de alginato son influenciadas por el nivel del oxígeno disuelto del cultivo (Leitão y Sá-Corriea 1997).

En *A. vinelandii* se ha establecido que la actividad AlgL es fundamental en la edición del alginato en etapas post-polimerización (Trujillo-Roldán et al. 2004), pero no se conoce el mecanismo celular que determina el tamaño del alginato. Considerando que los genes *algL* y *alg8* han sido descritos como determinantes en la producción de alginato, se utilizó la técnica de reversa transcripción y PCR en tiempo real (PCR-TR) para determinar el nivel de expresión de ambos genes en cultivos de *A. vinelandii* sometidos a diferentes condiciones de transferencia de oxígeno. La figura 6.16 muestra la influencia de la VTO sobre la expresión de *algL* y *alg8* en células crecidas bajo condiciones de limitación de oxígeno. Para propósitos de comparación, en la figura 6.16b se incluye el peso molecular y la concentración de alginato (mostrados anteriormente) obtenidos durante el crecimiento celular, bajo las mismas condiciones de cultivo.



**Figura 6.16.** Influencia de la máxima velocidad de transferencia de oxígeno sobre la expresión de los genes *algL* y *alg8* en cultivos de *A. vinelandii* realizados a diferentes velocidades de transferencia de oxígeno. En panel (a) (○) *alg8*, (▲) *algL*; en panel (b) (○) alginato, (▲) PMP alginato. Las muestras para el análisis por PCR-TR fueron recolectadas durante el crecimiento celular (cuando la VTO fue constante). La cantidad de mRNA del gen *gyrA* (que codifica para una subunidad de la DNA girasa) se usó como control interno para normalizar los resultados de la expresión de *algL* y *alg8* a las distintas condiciones estudiadas.

Los resultados muestran que *algL* y *alg8* aumentaron considerablemente su expresión al incrementarse la  $VTO_{max}$ , lo cual demuestra que la expresión de ambos genes (*algL* y *alg8*) es afectada por la velocidad de consumo de oxígeno del microorganismo.

Recientemente, Remminghorst y Rehm (2006b) demostraron que en cultivos de *P. aeruginosa*, la incorporación de *alg8* en un plásmido para complementar una mutante, aumentó 10 veces la concentración máxima de alginato. En nuestro trabajo, un aumento en la concentración del alginato (durante la fase de crecimiento celular) debido al incremento de la  $VTO_{max}$  es coincidente con una mayor expresión de *alg8* (Fig 6.16a), por lo cual los resultados sugieren que, en *A. vinelandii* al igual que en *P. aeruginosa*, un aumento en la síntesis de alginato está vinculado con una mayor expresión del gen *alg8*.

Los resultados también muestran que una disminución en el peso molecular (a más altas  $VTO_{max}$ ) podría estar relacionada con un incremento en la expresión del gen *algL*. Como fue mencionado anteriormente, se sabe que las alginato liasas (producto del gen *algL*) son enzimas responsables de editar el tamaño del alginato (Wong et al. 2000) y así una mayor expresión de *algL*, producto de un aumento en la velocidad de consumo de oxígeno (más alta  $VTO_{max}$ , cuando existe limitación de oxígeno), podría haber incrementado la hidrólisis del polímero, lo cual determinaría un peso molecular menor bajo esas condiciones de cultivo.

Estas evidencias sugieren que la expresión del gen *algL* depende de la velocidad de respiración celular y que el tamaño del alginato sintetizado es afectado por la expresión de *algL*. En este sentido, sería de utilidad evaluar la influencia de la VTO sobre el peso molecular y la expresión de algunos genes claves (por ejemplo *alg8*) en la síntesis de alginato, utilizando cepas mutantes como la SLM2, la cual se sabe no produce alginato liasas (Trujillo-Roldán et al. 2003a). Aunque los resultados utilizando técnicas de PCR en tiempo real son preliminares, sin duda abren la posibilidad de comprender mejor el proceso de polimerización-depolimerización del alginato en cultivos de *Azotobacter vinelandii*.

#### **6.7. Relación concentración-peso molecular del alginato**

Una disminución de la velocidad de transferencia de oxígeno incrementó el peso molecular del alginato y disminuyó la concentración del polímero obtenido durante la fase de crecimiento celular. Así, durante este periodo, la biosíntesis del alginato y la polimerización del alginato son influenciadas de manera opuesta por la velocidad de consumo de oxígeno del microorganismo. Aunque se pueden obtener pesos moleculares más altos del alginato a  $VTO_{max}$  más bajas, la concentración de alginato obtenida ( $< 1.6 \text{ g L}^{-1}$ ) está muy lejos de ser de interés comercial. En este trabajo, la función objetivo fue el peso molecular del alginato; sin embargo, resultaría interesante implementar nuevas estrategias de cultivo (por ejemplo, cultivos por lote alimentado a una VTO constante) que permitan incrementar la producción de alginato sin una disminución importante en el peso molecular del polímero.

### **6.8. Planteamiento final**

Los resultados de este trabajo indican que el peso molecular y la concentración del alginato son influenciados por la velocidad de transferencia de oxígeno. Bajo condiciones de limitación de oxígeno, la velocidad de consumo de oxígeno (respiración bacteriana) es igual a la velocidad de transferencia de oxígeno, por lo que los efectos observados sobre el peso molecular y la concentración del alginato puede ser atribuidos a la influencia que tiene la velocidad de respiración celular sobre el proceso de polimerización y depolimerización del alginato. Los resultados utilizando técnicas de biología molecular como PCR de tiempo real, sugieren que la expresión de los genes *alg8* y *algL* es afectada por la velocidad de consumo de oxígeno del microorganismo, lo que podría explicar los resultados de la producción de alginato obtenidos bajo condiciones de limitación de oxígeno.

Desde una perspectiva tecnológica y para una aplicación particular industrial (por ejemplo, farmacéutica), las evidencias obtenidas muestran la posibilidad de producir alginatos de alto peso molecular por manipulación de la VTO del cultivo. Además, sería de gran utilidad desarrollar un sistema para controlar la VTO durante el cultivo, como se ha desarrollado para otros sistemas (Zeng et al. 1994), lo cual permitiría mantener una velocidad de transferencia de oxígeno constante para producir alginatos de un peso molecular específico durante todo el cultivo.

## 7. Conclusiones

- En los cultivos realizados en biorreactor existió limitación de oxígeno, la cual se caracterizó porque la velocidad de transferencia de oxígeno fue constante y alcanzó su valor máximo ( $V_{TO_{max}}$ ) durante el periodo de crecimiento celular. Bajo esas condiciones, la velocidad de transferencia de oxígeno correspondió a la velocidad de consumo de oxígeno de las células.
- En este trabajo, por primera vez, la estimación en línea de la velocidad de transferencia de oxígeno, permitió establecer una vinculación directa entre la velocidad de consumo de oxígeno y la producción de alginato durante el crecimiento celular de *Azotobacter vinelandii*.
- Un incremento en la velocidad de transferencia de oxígeno favoreció la producción de alginato y disminuyó la síntesis de PHB, por lo cual la distribución de carbono entre ambos polímeros fue afectada por la velocidad de transferencia de oxígeno.
- La concentración de alginato y su peso molecular fueron influenciados de manera opuesta por la velocidad de transferencia de oxígeno. Es así que, en el rango de las velocidades de transferencia de oxígeno estudiadas ( $3.0$  a  $9.0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) y durante la etapa de limitación de oxígeno, se obtuvo la menor concentración de alginato ( $0.5 \text{ g L}^{-1}$ ) y el más alto peso molecular promedio ( $1560 \text{ kDa}$ ) cuando la VTO fue más baja.

- Aunque no se conoce el mecanismo exacto mediante el cual la VTO afecta la producción de alginato, las evidencias obtenidas con técnicas de biología molecular indican que la expresión de los genes *alg8* y *algL* se modifica al cambiar la VTO, lo que podría afectar tanto la concentración como del peso molecular del alginato sintetizado por *A. vinelandii* durante el crecimiento celular bajo condiciones de limitación de oxígeno.

## 8. Perspectivas

- Debido a que la velocidad de respiración afecta el peso molecular del alginato, es conveniente implementar el análisis de CO<sub>2</sub> gaseoso a la salida del biorreactor, con el fin de complementar el análisis, evaluando la influencia del cociente respiratorio sobre la producción de alginato.
- Considerando que en este estudio se utilizó acetato de amonio como fuente de nitrógeno en vez de extracto de levadura (que ha sido usado habitualmente en nuestro grupo en el IBT-UNAM); sería interesante estudiar la influencia de la VTO sobre el peso molecular del alginato en cultivos con extracto de levadura realizados en biorreactor.
- Con el fin de incrementar la producción de alginato en los cultivos limitados por oxígeno, se sugiere realizar cultivos por lotes alimentados. Con este tipo de cultivos, sería posible implementar cultivos alimentados en dos etapas: en una primera etapa se puede favorecer la producción de biomasa y en una segunda etapa, incrementar la concentración de alginato.
- Considerando las evidencias obtenidas sobre la influencia de la VTO en la expresión de los genes *alg8* y *algL* PCR de tiempo real, es conveniente continuar este tipo de análisis para comprender de manera más integral la influencia que tiene la velocidad de respiración sobre la polimerización del alginato.

- Desde un punto de vista tecnológico, sería conveniente diseñar un sistema de control de la VTO durante todo el cultivo, para así producir alginatos de un peso molecular específico. Asimismo, este sistema de control facilitaría la utilización de la VTO como criterio de escalamiento del proceso.

## 9. Bibliografía

- Albrecht M, Schiller N (2005) Alginate lyase (AlgL) activity is required for alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 187: 3869–3872
- Amanullah A, Serrano-Carreón L, Castro B, Galindo E, Nienow AW (1998) The influence of impeller type in pilot scale xanthan fermentations. *Biotechnol Bioeng* 57: 95-108
- Anderlei T, Büchs J (2001) Device for sterile online measurement of the oxygen transfer rate in shaking flasks. *Biochem Eng J* 7: 157-162
- Anderlei T, Zang W, Papaspyrou M, Büchs J (2004) Online respiration activity measurement (OTR, CTR, RQ) in shake flasks. *Biochem Eng J* 17: 187–194
- Anderson A, Hacking A, Dawes E (1987) Alternative pathways for the biosynthesis of alginate from fructose and glucose in *Pseudomonas mendocina* and *Azotobacter vinelandii*. *J Gen Microbiol* 133: 1045-1052
- Annison G, Couperwhite I (1986) Influence of calcium on alginate production and composition in continuous cultures of *Azotobacter vinelandii*. *Appl Microbiol Biotechnol* 25: 55-61
- Bakkevig K, Sletta H, Gimmestad M, Aune R, Ertesvåg H, Degnes K, Christensen B, Ellingsen T, Valla S (2005) Role of the *Pseudomonas fluorescens* alginate lyase (AlgL) in clearing the periplasm of alginates not exported to the extracellular environment. *J Bacteriol* 187: 8375–8384
- Barry T, Geary S, Hannify S, MacGearailt C, Shallo M, Heery D, Gannon F, Powell R (1992) Rapid mini-preparations of total RNA from bacteria. *Nuclei Acids Res* 20: 4940
- Beale J, Foster J (1996) Carbohydrate fluxes into alginate biosynthesis in *Azotobacter vinelandii* NCIB 8789: NMR investigations of the triose pools. *Biochem* 35: 4492-4501

- Beronio P, Tsao G (1993) Optimization of 2,3-butanediol production by *Klebsiella oxytoca* through oxygen transfer rate control. *Biotechnol Bioeng* 42: 1263-1269
- Brivonese A, Sutherland I-W (1989) Polymer production by a mucoid strain of *Azotobacter vinelandii* in batch culture. *Appl Microbiol Biotechnol* 30: 97-102
- Calik P, Yilgör P, Ayhan P, Demir A (2004) Oxygen transfer effects on recombinant benzaldehyde lyase production. *Chem Eng Science* 59: 5075 – 5083
- Chapman A, Fall L, Atkinson D (1971) Adenylate energy charge in *Escherichia coli* during growth and starvation. *J Bacteriol* 108: 1072-1086
- Charoenrat T, Ketudat-Cairns M, Stendahl-Andersen H, Jahic M, Enfors S-O (2005) Oxygen-limited fed-batch process: an alternative control for *Pichia pastoris* recombinant protein processes. *Bioprocess Biosyst Eng* 27: 399–406
- Charoenrat T, Ketudat-Cairns M, Jahic M, Veide A, Enfors S-O (2006) Increased total air pressure versus oxygen limitation for enhanced oxygen transfer and product formation in a *Pichia pastoris* recombinant protein process. *Biochem Eng J* 30: 205–211
- Chen J-Y, Wen CM, Chen T-L (1999) Effect of oxygen transfer on lipase production by *Acinetobacter radioresistens*. *Biotechnol Bioeng* 62: 311-316
- Clementi F, Fantozzi P, Mancini M, Moresi M (1995) Optimal conditions for alginate production by *Azotobacter vinelandii*. *Enzyme Microbial Technol* 17: 983-988
- Clementi F, Crudele M, Parente E, Manzini M, Moresi M (1999) Production and characterization of alginate from *Azotobacter vinelandii*. *J Sci Food Agric* 79: 602-610
- Davidson IW, Sutherland IW, Lawson C (1977) Localization of O-acetyl groups of bacterial alginate. *J Gen Microbiol* 98: 603-606

- Deavin L, Jarman T, Lawson C, Righelato R, Slocombe S (1977) The production of alginic acid by *Azotobacter vinelandii* in batch and continuous culture. En: *Extracellular Microbial Polysaccharides*, Sandford P, Laskin A (Eds). American Chemical Society, Washington, DC. p.14-26
- Ertesvåg H, Høidal H, Hals I, Rian A, Dosest B, Valla S (1995) A family of modular type mannuronan C-5-epimerase genes controls alginate structure in *Azotobacter vinelandii*. *Mol Microbiol* 16:719–731
- Ertesvåg H, Kristin H, Høidal H, Schjerven H, Glaerum B, Valla S (1999) Mannuronan C-5-epimerases and their application for in vitro and in vivo design of new alginates useful in biotechnology. *Metabolic Eng* 1: 262-269
- Gacesa P (1998) Bacterial alginate biosynthesis – recent progress and future prospects *Microbiology* 144: 1133–1143
- Galindo E, Peña C, Núñez C, Segura D, Espin G (2007) Molecular and bioengineering strategies to improve alginate and polyhydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii*. *Microbial Cell Factories* 6, 7:1-16
- García-Ochoa F, Gómez E, Santos V (2000) Oxygen transfer and uptake rates during xanthan gum production. *Enzyme Microb Technol* 27: 680–690
- Geddie J, Sutherland I (1994) The effect of acetylation on cation binding by algal and bacterial alginates. *Biotechnol Appl Biochem* 20: 117-129
- George S, Costenbader C, Melton T (1985) Diauxic growth in *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol* 164: 866-871
- Hahn S, Chang Y, Kim B, Lee K, Chan H (1993) The recovery of poly (3-hydroxybutyrate) by using dispersions of sodium hypochlorite solution and chloroform. *Biotechnol Tech* 7: 209-212

- Horan N, Jarman T, Dawes E (1981) Effects of carbon source and inorganic phosphate concentration on the production of alginic acid by a mutant of *Azotobacter vinelandii* and on the enzymes involved in its biosynthesis. *J Gen Microbiol* 127: 185-191
- Horan N, Jarman T, Dawes E (1983) Studies on some enzymes of alginic acid biosynthesis in *Azotobacter vinelandii* grown in continuous culture. *J Gen Microbiol* 129: 2985-2990
- Herbst H, Schumpe A, Deckwer W-D (1992) Xanthan production in stirred tank fermenters: oxygen transfer and scale-up. *Chem Eng Technol* 15: 425-434
- Jarman T, Deavin L, Slocombe S, Righelato R (1978) Investigation of the effect of environmental conditions on the rate of exopolysaccharide synthesis in *Azotobacter vinelandii*. *J Gen Microbiol* 107: 59-64
- Jarman T, Pace G (1984) Energy requirements of microbial exopolysaccharide synthesis. *Arch Microbiol* 137: 231-235
- Kaplan A (1969) The determination of urea, ammonia and urease. *Methods Biochem Anal* 17: 311-324
- Karr D, Waters J, Emerich D (1983) Analysis of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate in *Rhizobium japonicum* bacteroids by ion-exclusion high-pressure liquid chromatography and UV detection. *Appl Environ Microbiol* 46: 1339-1344
- Kennedy L, Kenneth McD, Sutherland I-W (1992) Alginases from *Azotobacter* species. *J Gen Microbiol* 138: 2465-2471
- Khatri N, Hoffmann F (2006) Impact of methanol concentration on secreted protein production in oxygen-limited cultures of recombinant *Pichia pastoris*. *Biotechnol Bioeng* 93: 871-879

- Klimek J, Ollis D (1980) Extracellular microbial polysaccharides: kinetics of *Pseudomonas sp.*, *Azotobacter vinelandii*, and *Aureobasidium pullulans* batch fermentations. *Biotechnol Bioeng* 22: 2321–42
- Kuhla J, Oelze J (1988) Dependence of nitrogenase switch-off upon oxygen stress on the nitrogenase activity in *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol* 170: 5325-5329
- Leitão J-H, Fialho A, Sá-Corriea I (1992) Effects of growth temperature on alginate synthesis and enzymes in *Pseudomonas aeruginosa* variants. *J Gen Microbiol* 138: 605-610
- Leitão J-H, Sá-Corriea I (1993) Oxygen-dependent alginate synthesis and enzymes in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gen Microbiol* 139: 441-445
- Leitão J-H, Sá-Corriea I (1997) Oxygen-depend upregulation of transcription of alginates genes *algA*, *algC* and *algD* in *Pseudomonas aeruginosa*. *Res Microbiol* 148: 37-43
- Lin L, Sadoff H (1968) Encystment and polymer production by *Azotobacter vinelandii* in the presence of  $\beta$ -hydrobutyrate. *J Bacteriol* 95: 2336-2343
- Livak K, Shmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  method. *Methods* 25: 402-408
- Maier U, Büchs J (2001) Characterisation of the gas–liquid mass transfer in shaking bioreactors *Biochem Eng J* 7: 99-106
- Mejía-Ruiz H, Guzman J, Moreno S, Soberon-Chavez G, Espin G (1997) The *Azotobacter vinelandii* *alg8* and *alg44* genes are essential for alginate synthesis and can be transcribed from an *algD*-independent promoter. *Gene* 199:271-277
- Mian F, Jarman T, Righelato R (1978) Biosynthesis of exopolysaccharide by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 134: 418-422

Millán M (2006) Estrategias para el escalamiento –de matraz a fermentador de 10 L- de la producción de alginatos por *Azotobacter vinelandii*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias e Ingeniería, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México.

Miller G (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. Anal Chem 31:426-428

Nagai S, Nishizawa Y, Onodera M, Aiba S (1971) Effect of dissolved oxygen on growth yield and aldolase activity in chemostat culture of *Azotobacter vinelandii*. J Gen Microbiol 66: 197-203

Nagai S, Aiba S (1972) Reassessment of maintenance and energy uncoupling in the growth of *Azotobacter vinelandii*. J Gen Microbiol 73: 531-538

Oelze J (2000) Respiratory protection of nitrogenase in *Azotobacter* species: is a widely held hypothesis unequivocally supported by experimental evidence? FEMS Microbiol Rev 24: 321-333

Page W, Tindale A, Chandra M, Kwon E (2001) Alginate formation in *Azotobacter vinelandii* UWD during stationary phase and the turnover of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate. Microbiol 147: 483–490

Parente E, Crudele M, Aquino M, Clementi F (1998) Alginate production by *Azotobacter vinelandii* DSM576 in batch fermentation. J Ind Microbiol Biotechnol 20: 171-176

Parente E, Crudele M, Ricciardi A, Mancini M, Clemente F (2000) Effect of ammonium sulphate concentration and agitation speed on the kinetics of alginate production by *Azotobacter vinelandii* DSM576 in batch fermentation. J Ind Microbiol Biotechnol 25: 242- 248

Patel N, Thibault J (2004) Evaluation of oxygen mass transfer in *Aspergillus niger* fermentation using data reconciliation. Biotechnol Prog 20: 239-247

- Peña C, Campos N, Galindo E (1997) Changes in alginate molecular mass distributions, broth viscosity and morphology of *Azotobacter vinelandii* cultured in shake flasks. *Appl Microbiol Biotechnol* 48: 510-515
- Peña C, Trujillo-Roldán M, Galindo E (2000) Influence of dissolved oxygen tension and agitation speed on alginate production and its molecular weight in cultures of *Azotobacter vinelandii*. *Enzyme Microb Technol* 27: 390-398
- Peña C, Hernández L, Galindo E (2006) Manipulation of the acetylation degree of *Azotobacter vinelandii* alginate by supplementing the culture medium with 3-(N-morpholino)-propane-sulfonic acid. *Lett Appl Microbiol* 43: 200-204
- Peña C, Peter C, Büchs J, Galindo E (2007) Evolution of the specific power consumption and oxygen transfer rate in alginate producing cultures of *Azotobacter vinelandii* conducted in shake flasks. *Biochem Eng J* doi:10.1016/j.bej.2007.02.019
- Pindar D, Bucke C (1975) The biosynthesis of alginic acid by *Azotobacter vinelandii*. *Biochem J* 152: 617-622
- Post E, Kleiner D, Oelze J (1983) Whole cell respiration and nitrogenase activities in *Azotobacter vinelandii* growing in oxygen controlled continuous culture. *Arch Microbiol* 134: 68-72
- Priego-Jiménez R, Peña C, Ramírez O, Galindo E (2005) Specific growth rate determines the molecular mass of the alginate produced by *Azotobacter vinelandii*. *Biochem Eng J* 25: 187–193
- Rehm B, Valla S (1997) Bacterial alginates: biosynthesis and applications *Appl Microbiol Biotechnol* 48: 281-288
- Remminghorst U, Rehm B (2006a) Bacterial alginates: from biosynthesis to applications. *Biotechnol Lett* 28: 1701–1712

- Remminghorst U, Rehm B (2006b) In vitro alginate polymerization and the functional role of alg8 in alginate production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* 72: 298-305
- Reyes C, Peña C, Galindo E (2003) Reproducing shake flasks performance in stirred fermentors: production of alginates by *Azotobacter vinelandii*. *J Biotechnol* 105: 189-198
- Reyes C (2003) Escalamiento –de matraz a fermentador de laboratorio- de la producción de alginatos por *Azotobacter vinelandii*. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Richard A, Margaritis A (2003) Rheology, oxygen transfer and molecular weight characteristics of poly(glutamic acid) fermentation by *Bacillus subtilis*. *Biotechnol Bioeng* 82: 299-305
- Sabra W, Zeng A-P, Sabry S, Omar S, Deckwer W-D (1999) Effect of phosphate and oxygen concentrations on alginate production and stoichiometry of metabolism of *Azotobacter vinelandii* under microaerobic conditions. *Appl Microbiol Biotechnol* 52: 773-780
- Sabra W, Zeng A-P, Lunsdorf H, Deckwer W-D (2000) Effect of oxygen on formation and structure of *Azotobacter vinelandii* alginate and its role in protecting nitrogenase. *Appl Environ Microbiol* 66: 4037-4044
- Sabra W, Zeng A-P, Deckwer W-D (2001) Bacterial alginate: physiology, product quality and process aspects. *Appl Microbiol Biotechnol* 56:315–325
- Sadoff H (1975) Encystment and germination in *Azotobacter vinelandii*. *Bacteriol Rev* 39: 516-539
- Sahoo D, Agarwal G (2002) Effect of oxygen transfer on glycerol biosynthesis by an osmophilic yeast *Candida magnoliae* I<sub>2</sub>B. *Biotechnol Bioeng* 78: 545-555

- Saude N, Junter G-A (2002) Production and molecular weight characteristics of alginate from free and immobilized-cell cultures of *Azotobacter vinelandii*. *Process Biochem* 37: 895–900
- Saude N, Chéze-Lange H, Beunard D, Dhulster P, Guillochon D, Cazé A-M, Morcellet M, Junter G-A (2002) Alginate production by *Azotobacter vinelandii* in a membrane bioreactor. *Process Biochem* 38: 273-/278
- Schilling B, Rau U, Maier T, Fankhauser P (1999) Modeling and scale-up of the unsterile scleroglucan production process with *Sclerotium rolfsii* ATCC 15205. *Biopr Eng* 20: 195-201
- Senior P, Dawes E (1973) The regulation of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. *Biochem J* 134:225-238
- Still G, Wang C (1964) Glucose catabolism in *Azotobacter vinelandii*. *Arch Biochem Biophys* 105: 126-132
- Stöckmann C, Maier U, Anderlei T, Knocke C, Gellissen G, Büchs J (2003) The oxygen transfer rate as key parameter for the characterization of *Hansenula polymorpha* screening cultures. *J Ind Microbiol Biotechnol* 30: 613–622
- Sutherland IW (1977) Microbial exopolysaccharide synthesis. In: Sandford PA, Laskin A (eds) *Extracellular Microbial Polysaccharides*. American Chemical Society, Washington DC.
- Tatnell P, Russell N, Gacesa P (1994) GDP-mannose dehydrogenase is the key regulatory enzyme in alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence from metabolite studies. *Microbiol* 140:1745–1754
- Tauchert J, Oelze J (1990) Control of diauxic growth of *Azotobacter vinelandii* on acetate and glucose. *J Bacteriol* 172: 6447-6451

- Trujillo-Roldán M, Peña C, Ramírez O, Galindo E (2001) Effect of oscillating dissolved oxygen tension on the production of alginate by *Azotobacter vinelandii*. *Biotechnol Prog* 17: 1042-1048
- Trujillo-Roldán M, Moreno S, Segura D, Galindo E, Espín G (2003a) Alginate production by an *Azotobacter vinelandii* mutant unable to produce alginate lyase. *Appl Microbiol Biotechnol* 60: 733-737
- Trujillo-Roldán M, Peña C, Galindo E (2003b) Components in the inoculum determine the kinetics of *Azotobacter vinelandii* cultures and the molecular weight of its alginate. *Biotechnol Lett* 25: 1251-1254
- Trujillo-Roldán M, Moreno S, Espín G, Galindo E (2004) The roles of oxygen and alginate-lyase in determining the molecular weight of alginate produced by *Azotobacter vinelandii*. *Appl Microbiol Biotechnol* 63: 742-747
- Vargas-García M, López M, Elorrieta M, Suárez F, Moreno J (2001) Influence of nutritional and environmental factors on polysaccharide production by *Azotobacter vinelandii* cultured on 4-hydroxybenzoic acid. *J Ind Microbiol Biotechnol* 27: 5–10
- Varma A, Boesch B, Palsson B (1993) Stoichiometric interpretation of *Escherichia coli* glucose catabolism under various oxygenation rates. *Appl Environ Microbiol* 59: 2465-2473
- Wong T, Yao X (1995) The DeLey-Doudoroff pathway of galactose metabolism in *Azotobacter vinelandii*. *Appl Environ Microbiol* 60: 2065-2068
- Wong T, Preston L, Schiller N (2000) Alginate lyase: Review of major sources and enzyme characteristics, structure-function analysis, biological roles, and applications. *Annu Rev Microbiol* 54:289–340

Zeng A-P, Byun T, Posten C, Deckwer W-D (1994) Use of the respiratory quotient as a control parameter for optimum oxygen supply and scale-up of 2,3-butanediol production under microaerobic conditions. *Biotechnol Bioeng* 19: 1107–1114

Zimmermann H, Anderlei T, Büchs J, Binder M (2006) Oxygen limitation is a pitfall during screening for industrial strains. *Appl Microbiol Biotechnol* 72: 1157–1160

## 10. Anexos

### ANEXO A

Como resultado de este trabajo, se publicó el siguiente manuscrito:

1. Díaz-Barrera A, Peña C, Galindo E (2007). The oxygen transfer rate influences the molecular mass of the alginate produced by *Azotobacter vinelandii*. Appl Microbiol Biotechnol 76: 903–910

## The oxygen transfer rate influences the molecular mass of the alginate produced by *Azotobacter vinelandii*

A. Díaz-Barrera · C. Peña · E. Galindo

Received: 16 March 2007 / Revised: 25 May 2007 / Accepted: 30 May 2007 / Published online: 28 June 2007  
© Springer-Verlag 2007

**Abstract** The influence of oxygen transfer rate (OTR) on the molecular mass of alginate was studied. In batch cultures without dissolved oxygen tension (DOT) control and at different agitation rates, the DOT was nearly zero and the OTR was constant during biomass growth, hence the cultures were oxygen-limited. The OTR reached different maximum levels ( $OTR_{max}$ ) and enabled to establish various relative respiration rates. Overall, the findings showed that OTR influences alginate molecular mass. The mean molecular mass (MMM) of the alginate increased as  $OTR_{max}$  decreased. The molecular mass obtained at  $3.0 \text{ mmol l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  was 7.0 times higher (1,560 kDa) than at  $9.0 \text{ mmol l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (220 kDa). An increase in molecular mass can be a bacterial response to adverse nutritional conditions such as oxygen limitation.

**Keywords** Oxygen transfer rate · Alginate · Molecular mass · Oxygen limitation

### Introduction

Alginate is a biopolymer, which presents a wide range of applications such as thickener, stabilizer, gelling agent, and emulsifier in the food as well as textile and pharmaceutical industries. Recently, a promising potential application in the medical field (e.g., in control release of medical drugs) has been developed (Remminghorst and Rehm 2006a). Currently, commercial alginates are extracted from marine

algae but can also be produced by the bacterium *Azotobacter vinelandii*. This bacterium is an obligate aerobe able to fix nitrogen, which depends on the activity of a nitrogenase enzyme complex, which is highly oxygen-sensitive (Kuhla and Oelze 1988). *A. vinelandii* also produces the intracellular polymer poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB), and the synthesis of both polymers is strongly affected by dissolved oxygen concentration (Galindo et al. 2007).

It is generally recognized that dissolved oxygen tension (DOT) control is of critical importance for alginate synthesis and the MMM of the polymer produced by *A. vinelandii* (Sabra et al. 1999; Trujillo-Roldán et al. 2004). Usually, alginate production by *A. vinelandii* has been studied at different DOT levels (Peña et al. 2000; Sabra et al. 2000). In fact, different studies have been conducted under controlled DOT, keeping the DOT constant by gas blending (Peña et al. 2000) or varying agitation rate (Parente et al. 1998). On this regard, it is interesting to point out that *A. vinelandii* is known for their high respiratory activity (Post et al. 1983) and in cultures without DOT control; oxygen transfer becomes the limiting factor for the growth of the microorganism. Without DOT control, the cultures operate at DOT nearly zero and under that condition, a parameter than can be utilized for the study of alginate production is the oxygen transfer rate (OTR). In aerobic cultures, the cellular activity is coupled to the oxygen uptake rate (OUR), making OTR an excellent indicator of cellular metabolism. Biological phenomena such as oxygen limitation, other nutrient limitation, and diauxic growth can be identified by the evolution of the OTR (Anderlei and Büchs 2001).

There are several reports regarding the measurement of OTR during fermentation processes (Chen et al. 1999; Sahoo and Agarwal 2002; Richard and Margaritis 2003; Anderlei et al. 2004; Charoenrat et al. 2006); however, to

A. Díaz-Barrera · C. Peña · E. Galindo (✉)  
Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Post. 510-3,  
Cuernavaca 62250 Morelos, Mexico  
e-mail: galindo@ibt.unam.mx

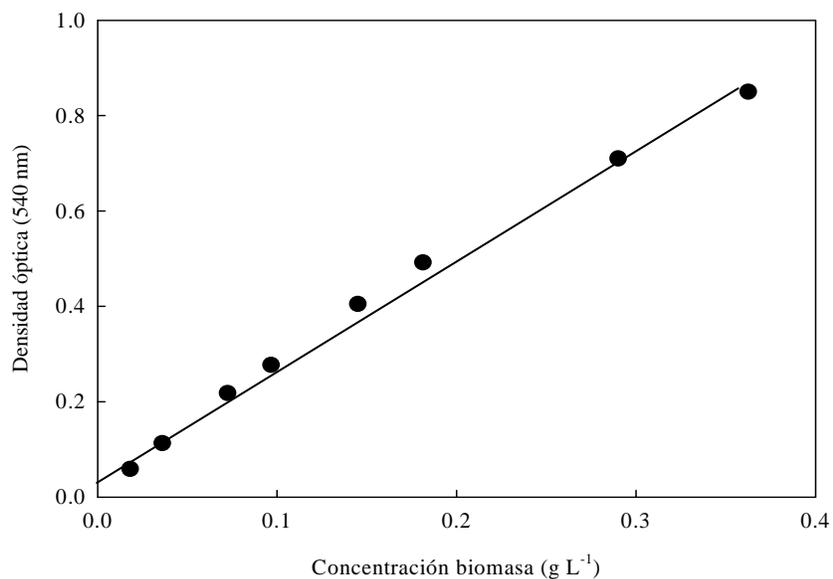
## ANEXO B

### Determinación de biomasa por espectrofotometría

La determinación de biomasa se realizó de la siguiente manera:

- Por cada 10 mL de caldo de cultivo se adicionó 1.0 mL de EDTA (0.1 M) y 1.0 mL de NaCl (1.0 M). Luego la muestra fue centrifugada (centrífuga Eppendorf, modelo 5804) a 8,000 rpm durante 10 min.
- El sobrenadante fue separado del paquete celular decantado. La biomasa obtenida fue lavada 3 veces con una mezcla de EDTA 0.1 M: NaCl 1 M (1:1 v/v) y centrifugada (8,000 rpm por 10 min) nuevamente. El paquete celular fue filtrado al vacío en membranas *Millipore* de 0.45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro. Previamente, los filtros (sin biomasa) fueron secados durante 24 h a 80° C en una estufa y luego pesados.
- La membrana con el paquete celular fue secada por 24 horas a 80° C en una estufa, y luego pesada para obtener por diferencia de peso la cantidad de biomasa.
- Paralelamente, se tomaron 10 mL de caldo de cultivo y se hicieron diluciones (entre 2 y 50 veces), se midió la absorbancia (a 540 nm) a cada una de las diluciones contra un blanco de agua destilada.

Los valores de absorbancia fueron correlacionados con la biomasa medida y se obtuvo una curva de calibrado. En la figura B-1 se muestra la curva de calibrado obtenida para la determinación espectrofotométrica de biomasa.



**Figura B-1.** Curva de calibrado para la determinación de biomasa por espectrofotometría.

De la regresión lineal de los datos de la curva de calibrado se obtuvo la siguiente ecuación:

$$Biomasa \left( \frac{g}{L} \right) = \left[ \frac{Absorbancia - 0.0466}{2.2883} \right] \quad r^2 = 0.9936 \quad (B.1)$$

## ANEXO C

### Cuantificación de alginato por precipitación con isopropanol

El procedimiento aplicado para cuantificar el alginato fue el siguiente:

- A 10 mL de caldo de cultivo se le adicionaron 1.0 mL de EDTA (0.1 M) y 1.0 mL de NaCl (1.0 M). Se centrifugó a 8,000 rpm durante 10 min (centrífuga Eppendorf, modelo 5804).
- Al sobrenadante obtenido, se le adicionaron 30 mL de isopropanol y se dejó reposar por 10 min para la precipitación del producto.
- El producto se filtró en membranas *Millipore* de 0.2  $\mu\text{m}$ , previamente secadas durante 24 h a 80° C en una estufa y posteriormente pesadas.
- La membrana con el producto fue secada por 24 horas a 80° C en la estufa, para finalmente pesarse y obtener por diferencia de peso la cantidad de alginato.

Para la recuperación del alginato en los cultivos realizados a 260 rpm, fue necesario precipitar un volumen de 30 mL de caldo de cultivo.

## ANEXO D

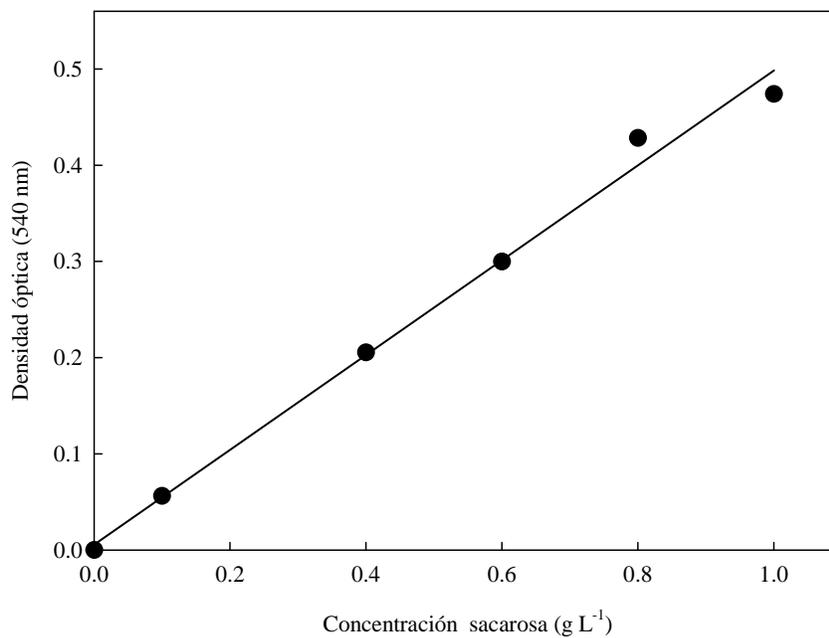
### Determinación de sacarosa por el método $\beta$ -fructofuranosidasa-DNS

Las soluciones utilizadas en este procedimiento fueron preparadas como sigue. La solución de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico, Sigma Chemical Co.) se preparó con 16 g de hidróxido de sodio y 300 g de tartrato de sodio mezclados en un volumen determinado de agua destilada. La disolución total se completó con la adición de 10 g de DNS, calentando la solución y adicionado lentamente el DNS para evitar su precipitación. La solución enzimática se preparó mezclando 2.5 mg de la enzima  $\beta$ -fructofuranosidasa (Gist-Brocades con una actividad de 243 U mg<sup>-1</sup> a 40° C) con 1.0 mL de amortiguador de citrato (0.32 M, pH 4.6).

El procedimiento para el análisis de azúcares reductores fue el siguiente:

- La muestra de caldo de cultivo fue centrifugada a 8,000 rpm durante 10 min.
- El sobrenadante obtenido fue diluido convenientemente (entre 20 y 25 veces) y 0.9 mL de esta solución fue mezclada con 0.1 mL de la solución enzimática.
- La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 10 min y posteriormente se adicionó 1.0 mL de DNS a cada muestra.
- Los tubos se calentaron en un baño de agua a ebullición durante 5 min y enseguida se enfriaron en hielo.
- A cada tubo se le adicionaron 10 mL de agua destilada y se leyó la absorbancia a 540 nm (espectrofotómetro Beckman DU 650) contra un blanco de reactivos.

La concentración de sacarosa fue extrapolada de una curva de calibrado (figura D-1), la cual fue elaborada utilizando soluciones de sacarosa en concentraciones que van desde 0.1 a 1.0 g L<sup>-1</sup> y aplicando el mismo procedimiento descrito anteriormente.



**Figura D-1.** Curva de calibrado para la determinación de sacarosa por el método DNS.

De la regresión lineal de los datos de la curva de calibrado se obtuvo la siguiente ecuación:

$$Sacarosa\left(\frac{g}{L}\right) = \left[ \frac{Absorbancia - 0.0069}{0.4904} \right] \quad r^2 = 0.9923 \quad (D.1)$$

## ANEXO E

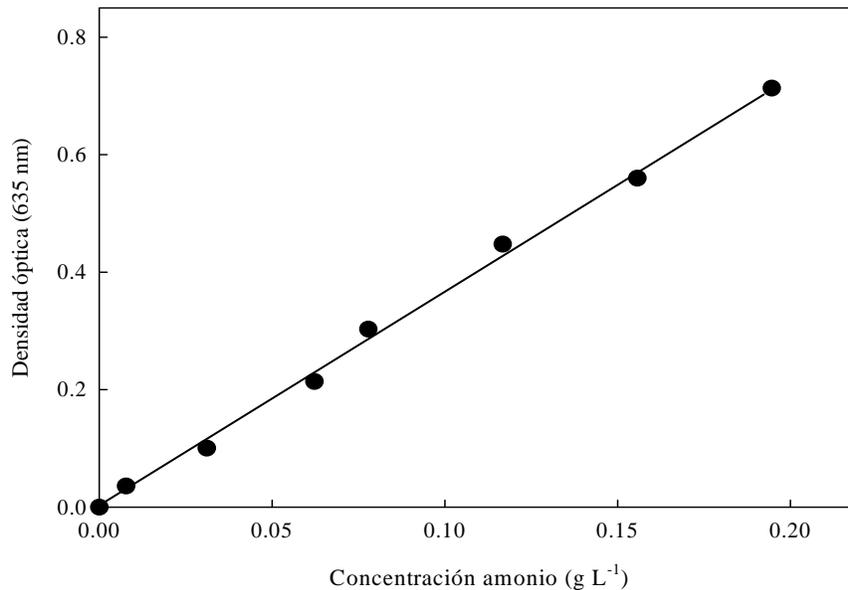
### Determinación de la concentración de amonio por el método fenol-hipoclorito

Las soluciones utilizadas en este procedimiento tienen la siguiente composición. La solución A estuvo compuesta por fenol 0.106 M y nitroferricianuro de sodio 0.17 mM. La solución B se compuso por hidróxido de sodio 0.125 N e hipoclorito de sodio 11mM. Todas las soluciones y diluciones de las muestras fueron preparadas con agua desionizada tipo II (agua *Milli Q*).

El procedimiento para el análisis de amonio fue el siguiente:

- La muestra de caldo de cultivo fue centrifugada a 8,000 rpm durante 10 min.
- El sobrenadante obtenido fue diluido convenientemente (entre 5 y 10 veces) y a 25  $\mu\text{L}$  de esta solución se le adicionó 1.0 mL de solución A. La mezcla fue agitada en vortex.
- Se adicionó 1.0 mL de solución B y se agitó nuevamente en un vortex.
- Los tubos de reacción fueron incubados por 30 min a temperatura ambiente en un baño de agua y protegidos de la luz con papel aluminio.
- Luego de 30 min las muestras desarrollaron un color “azul de prusia” y se leyó la absorbancia a 635 nm (espectrofotómetro Beckman DU 650) contra un blanco de reactivos.

La concentración de amonio se extrapoló de la curva de calibrado (figura E-1), la cual fue elaborada utilizando soluciones de acetato de amonio en concentraciones que van desde 0.008 a 0.19  $\text{g L}^{-1}$  y aplicando el mismo procedimiento descrito anteriormente.



**Figura E-1.** Curva de calibrado para la determinación de amonio por el método fenol-hipoclorito.

De la regresión lineal de los datos de la curva de calibrado se obtuvo la siguiente ecuación:

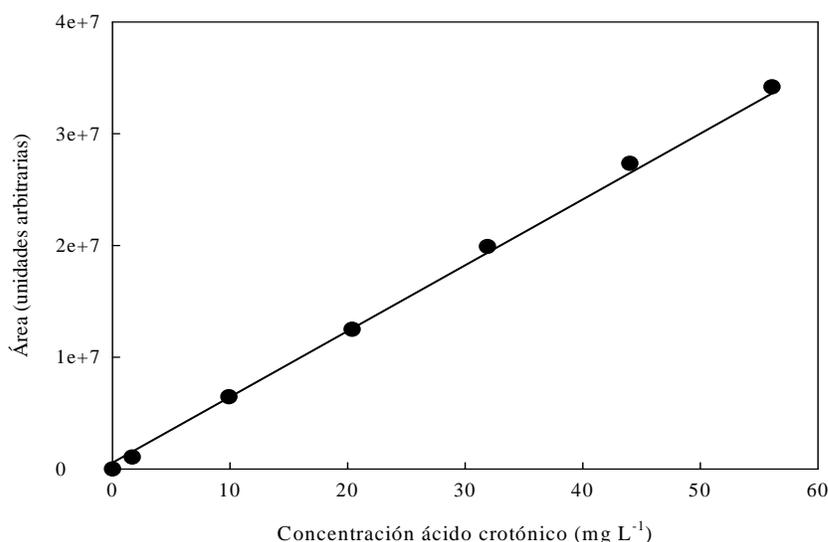
$$\text{Amonio} \left( \frac{\text{g}}{\text{L}} \right) = \left[ \frac{\text{Absorbancia} + 0.000005}{3.6731} \right] \quad r^2 = 0.9973 \quad (\text{E.1})$$

**ANEXO F****Recuperación de PHB y curva de calibración del análisis de PHB por HPLC-UV**

La recuperación del PHB se realizó aplicando el siguiente procedimiento:

- La muestra de biomasa fue lavada con 3 mL de NaCl 1.0 M por tres veces.
- Se secó la muestra a vacío en una centrífuga Eppendorf durante 1 h.
- Una muestra de 2.5-3.5 mg de biomasa seca fue pesada y mezclada con 2.0 mL de cloroformo y 2.0 mL de hipoclorito de sodio (30 % v/v a partir de un hipoclorito comercial del 6 %).
- La mezcla fue incubada a 200 rpm, 30 °C por 90 min.
- Los tubos se centrifugaron (centrífuga Eppendorf) a 5000 rpm por 10 min.
- Se descartó la fase superior (que contiene hipoclorito) y los restos celulares fueron retirados (con una jeringa) de la fase inferior que contiene cloroformo.
- La fase inferior que contiene cloroformo libre de restos celulares fue filtrada (filtro Whatman N° 1) y luego centrifugada al vacío para evaporar el cloroformo.
- Al tubo con PHB se le adicionó 1.0 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado y fue llevado a un baño de agua a 90° C durante 30 min.
- Finalmente, la solución resultante fue enfriada y diluida convenientemente con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.014 N para el análisis por HPLC-UV a 211 nm.

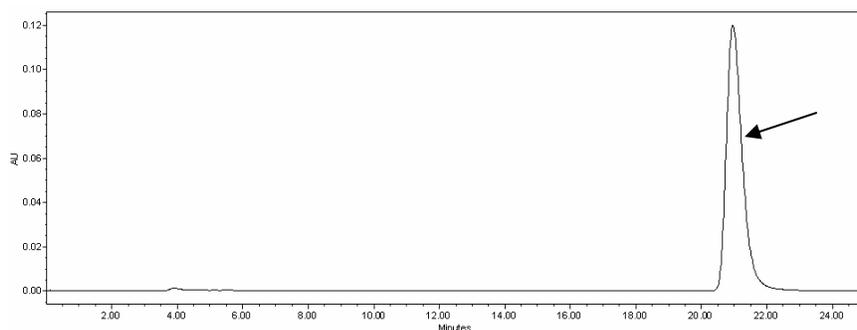
La concentración de ácido crotonico (producto de la hidrólisis del PHB) fue extrapolada utilizando una curva de calibrado (figura F-1), la cual fue elaborada utilizando soluciones de PHB comercial (Sigma Chemical Co.) en concentraciones que van desde 1.7 a 56.1 mg L<sup>-1</sup>. Una solución concentrada de PHB comercial (100 mg L<sup>-1</sup>) fue mezclada con 1.0 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado y llevada a un baño de agua a 90°C durante 30 min. La solución resultante fue enfriada y diluida convenientemente con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.014 N para el análisis por HPLC-UV a 211 nm.



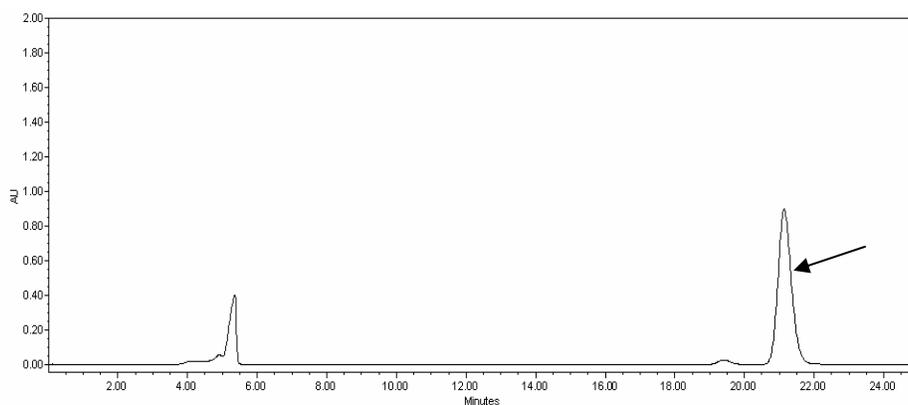
**Figura F-1.** Curva de calibrado para la determinación de ácido crotonico por HPLC-UV.

De la regresión lineal de los datos de la curva de calibrado se obtuvo la siguiente ecuación:

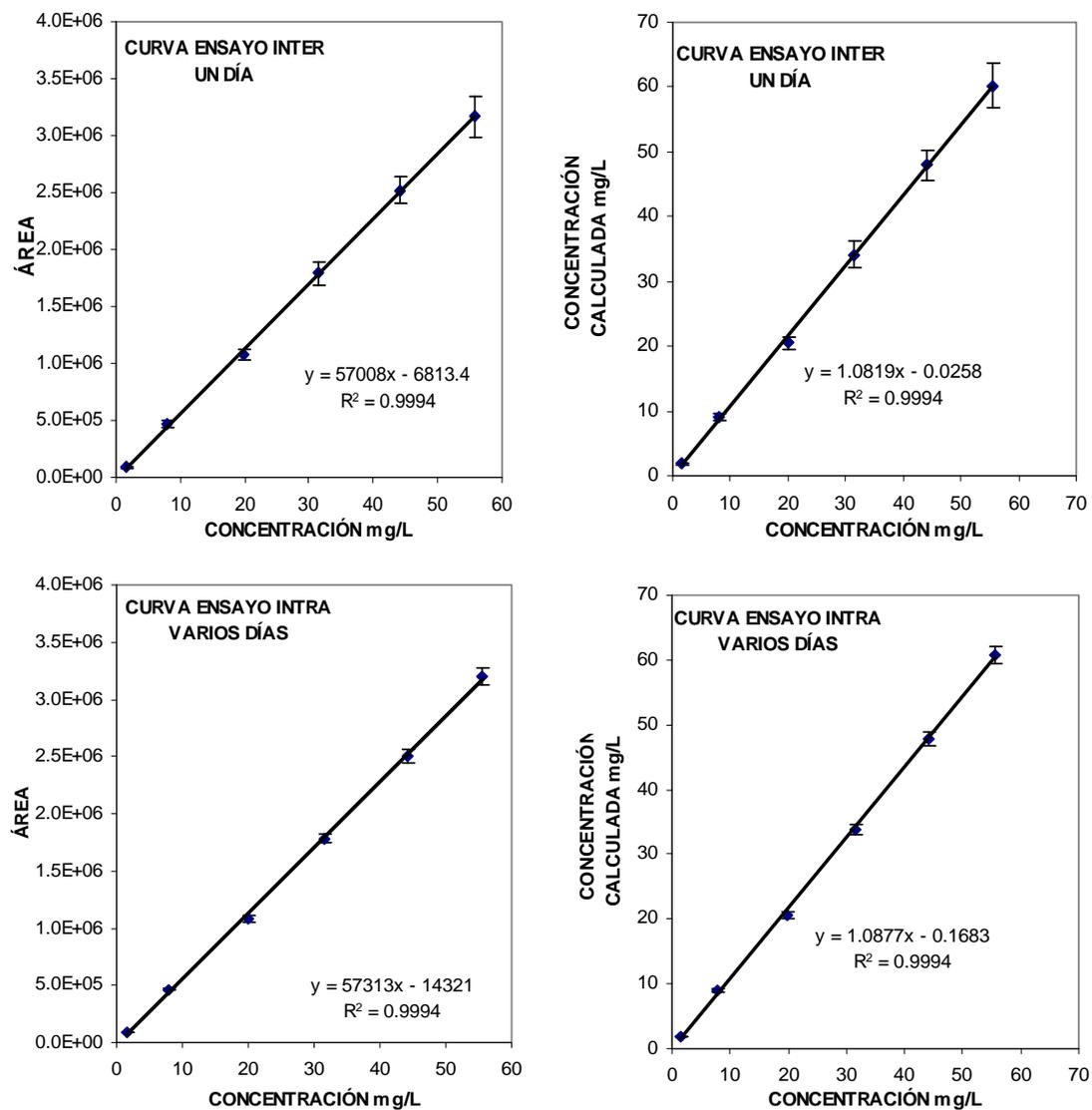
$$\text{Crotonico} \left( \frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \left[ \frac{\text{Área} - 139953}{612461} \right] \quad r^2 = 0.9997 \quad (\text{F.1})$$

**ANEXO G****Cromatogramas y ensayos de validación obtenidos en la implementación de la determinación de PHB por el método de HPLC-UV**

**Figura G-1. Cromatograma de ácido crotonico comercial. La flecha indica el pico de ácido crotonico.**



**Figura G-2. Cromatograma del producto del tratamiento del PHB comercial con ácido sulfúrico. La flecha indica el pico del producto del tratamiento del PHB.**



**Figura G-3.** Ensayos para la validación del método HPLC-UV para la determinación de PHB.

Tabla G-1. Ensayo Inter.

<b>CONCENTRACIÓN</b>						
<b>(mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>1.575</b>	<b>7.875</b>	<b>19.950</b>	<b>31.500</b>	<b>44.100</b>	<b>55.650</b>
<b>PRIMERA*</b>	1.7	8.5	19.4	32.4	46.2	58.6
<b>SEGUNDA</b>	1.9	9.6	22.1	37.5	51.6	65.7
<b>TERCERA</b>	1.7	8.3	20.8	35.1	49.4	56.5
<b>CUARTA</b>	1.8	9.4	19.6	32.1	45.1	57.4
<b>QUINTA</b>	1.7	9.3	20.5	33.5	47.4	60.7
<b>SEXTA</b>	1.9	9.3	20.8	34.2	48.1	62.4
<b>MEDIA</b>	1.8	9.1	20.5	34.1	47.90	60.2
<b>DS</b>	0.1	0.5	1.0	2.0	2.3	3.4
<b>C.V. (%)</b>	5.8	5.7	4.7	5.9	4.8	5.7

\*, Número de repetición; DS, desviación estándar; C.V., coeficiente de variación; ERR. REL., error relativo de la media

Tabla G-2. Ensayo Intra.

<b>CONCENTRACIÓN</b>						
<b>N</b>	<b>1.575</b>	<b>7.875</b>	<b>19.950</b>	<b>31.500</b>	<b>44.100</b>	<b>55.650</b>
<b>(mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>1.575</b>	<b>7.875</b>	<b>19.950</b>	<b>31.500</b>	<b>44.100</b>	<b>55.650</b>
<b>PRIMERA*</b>	1.7	8.9	19.8	32.7	45.9	58.7
<b>SEGUNDA</b>	1.9	9.1	21.3	34.7	48.7	61.9
<b>TERCERA</b>	1.8	8.6	20.4	33.6	47.5	60.0
<b>CUARTA</b>	1.8	8.9	20.5	34.1	47.9	61.3
<b>QUINTA</b>	1.9	9.3	21.1	34.7	49.1	62.4
<b>SEXTA</b>	1.8	8.8	20.1	33.7	47.4	60.3
<b>MEDIA</b>	1.8	8.9	20.5	33.9	47.8	60.8
<b>DS</b>	0.1	0.2	0.6	0.8	1.1	1.4
<b>C.V. (%)</b>	3.5	2.5	2.9	2.2	2.4	2.2

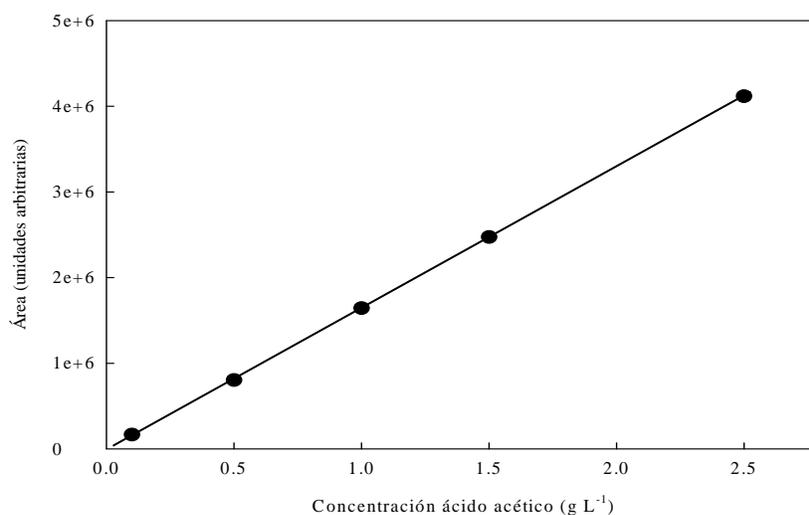
\*, Número de repetición; DS, desviación estándar; C.V., coeficiente de variación; ERR. REL., error relativo de la media

Las tablas G-1 y G-2 muestran los resultados de los ensayos inter e intra. Los coeficientes de variación presentados variaron entre 4.7 y 5.9% para el ensayo inter y entre 2.2 y 3.5% para el ensayo intra. Los resultados demuestran que la técnica implementada es precisa.

## ANEXO H

## Curva de calibración para la determinación de acetato por HPLC-UV

Para elaborar la curva de calibración se utilizaron soluciones de ácido acético comercial en concentraciones que van desde 0.1 a 2.5 g L<sup>-1</sup>. La curva de calibración se muestra en la figura H-1.



**Figura H-1.** Curva de calibrado para la determinación de acetato por HPLC-UV.

De la regresión lineal de los datos de la curva de calibrado se obtuvo la siguiente ecuación:

$$\text{Acético} \left( \frac{\text{g}}{\text{L}} \right) = \left[ \frac{\text{Área} + 7340}{2000000} \right] \quad r^2 = 0.9999 \quad (\text{H.1})$$

## ANEXO I

### Preparación de muestras para el análisis del peso molecular del alginato

El procedimiento de preparación de muestras para el análisis de peso molecular por GPC fue el siguiente:

- El alginato fue precipitado con isopropanol en una proporción 3:1
- El alginato precipitado fue transferido a tubos Eppendorf de 2.0 mL y luego centrifugado a vacío (centrífuga Eppendorf) durante 1 h para secar la muestra y eliminar los residuos de isopropanol. En algunas ocasiones, previamente fue necesario centrifugar (8,000 rpm por 10 min) el precipitado para luego transferirlo al tubo Eppendorf.
- El sólido seco resultante se molió. Se pesaron 6 mg (o 3 mg) y se resuspendieron en 2 mL (o 1 mL) de  $\text{NaNO}_3$  0.1 M para obtener una concentración final de  $3.0 \text{ mg mL}^{-1}$  de polisacárido para analizar. La solución se dejó por 24 h para lograr una completa disolución.
- La muestra disuelta se filtró en membrana *Millipore* de  $0.45 \mu\text{m}$  y la solución filtrada fue transferida a viales para la inyección en el HPLC.

Todas las curvas de calibración fueron construidas a partir de los resultados de tres réplicas independientes. En cada figura de las curvas de calibración, se grafica sólo el promedio de las mediciones realizadas.