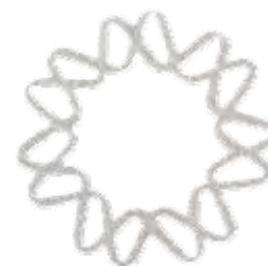




**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA



Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis

**Producción de alginato en cultivo lote alimentado
mediante una cepa mutante de *Azotobacter vinelandii*
incapaz de sintetizar poli- β -hidroxibutirato**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

Biol. Miguel Ángel Mejía Mandujano

Tutor: Dr. Carlos F. Peña Malacara

Junio 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 fue realizado en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México en el laboratorio del Dr. Enrique Galindo y bajo la asesoría del Dr. Carlos Felipe Peña Malacara. Durante la realización de este trabajo, se contó con el apoyo económico de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) a través del proyecto IN-230407-2, así como el apoyo de la beca CONACYT.

Agradecimientos

Al Dr. Enrique Galindo Fentanes, por haberme permitido formar parte de su grupo de trabajo y por la confianza brindada durante la realización del presente trabajo.

Al Dr. Carlos F. Peña Malacara por la tutoría con la que me ha formado, por su tiempo, su constante motivación, sus conocimientos y la por continua discusión de ideas aportadas para hacer este proyecto posible.

A los miembros del comité tutorial, Dres. Daniel Segura y Guillermo Gosset, por su valiosa colaboración durante el desarrollo de este proyecto.

A los miembros del jurado, por la revisión crítica de la tesis, por sus comentarios y sugerencias.

Dr. Mario Soberón Chávez.

Dr. Alfredo Martínez Jiménez.

Dra. Mónica A. Meraz Rodríguez.

Dra. Cinthia E. Núñez López.

Dr. Carlos F. Peña Malacara.

A la Dra. Marisol Córdova, por su ayuda técnica y asesoría en el manejo del reómetro.

En especial a Celia flores, por su valiosa ayuda, sus comentarios y su amistad.

A mis amigos y compañeros: Martha Alicia, Lupita, Rocío, Ivette, Diana, Álvaro, Modesto, David, Esteban, Alfonso, Eliane, Axel, Daniela, Yuridia, Maru y Tania, gracias por su apoyo incondicional y por los gratos momentos compartidos.

¡¡A todos ellos mi agradecimiento mas profundo!!

Índice general

	Página
Resumen	1
1 Introducción	2
2 Antecedentes	4
2.1 Generalidades	4
2.2 Estructura y propiedades del alginato	5
2.2.1 Alginatos microbianos	7
2.2.2 Aplicaciones comerciales de los Alginatos	8
2.3 Biosíntesis del alginato	10
2.4 Biosíntesis del poli-β-hidroxibutirato	10
2.4.1 Genes de la biosíntesis del poli- β -hidroxibutirato	11
2.4.2 Función biológica del poli- β -hidroxibutirato	12
2.5 Producción de alginato por vía fermentativa	13
2.6 Uso de cepas mutantes en la producción de alginato	14
2.6.1 Mutante AT6 de <i>A. vinelandii</i>	15
2.7 Cultivos alimentados	17
3 Justificación	19
4 Hipótesis	19

5 Objetivos	20
5.1 Objetivos específicos	20
6 Estrategia experimental	21
7 Materiales y métodos	23
7.1 Microorganismo, medio de cultivo y condiciones de crecimiento	23
7.1.2 Inóculo	23
7.1.3 Cultivos en lote	24
7.1.5 Cultivos alimentados	24
7.2 Métodos analíticos	25
7.2.1 Determinación de la biomasa	25
7.2.2 Determinación de la biomasa por gravimetría	26
7.2.3 Determinación de la biomasa por turbidimetría	27
7.2.4 Determinación de ácidos orgánicos	28
7.2.5 Extracción y cuantificación del alginato	28
7.2.6 Determinación de sacarosa	28
7.2.7 Distribución del peso molecular	29
7.2.8 Determinación de PHB por HPLC-UV	30
7.2.9 Análisis reológico	30
8 Resultados y discusión	32
8.1 Crecimiento de la mutante AT6 en condiciones no diazotróficas de alta aireación	32
8.2 Crecimiento de la mutante AT6 en condiciones diazotróficas y de alta aireación	36

8.3 Crecimiento de la mutante AT6 en condiciones diazotróficas y de baja aireación	39
8.4 Efecto de la fuente de carbono sobre el crecimiento de la mutante AT6 a nivel fermentador en condiciones diazotróficas	42
8.5 Cultivo en lote de la mutante AT6 a nivel fermentador con fuente de nitrógeno	46
8.6. Cultivo alimentado de la mutante AT6 a nivel fermentador	50
8.7. Cultivo alimentado de la cepa silvestre a nivel fermentador	54
8.8 Peso molecular del alginato obtenido durante los cultivos en fermentador	60
8.9 Análisis reológico del alginato obtenido durante los cultivos alimentados	64
9 Conclusiones	68
10 Perspectivas	69
11 Referencias	70

Índice de figuras

	Página
Figura 2.1 Estructura química del alginato	5
Figura 2.2 Estructura tipo “caja de huevos” en relación con la unión de cationes divalentes a secuencias de ácido gulurónico	6
Figura 2.3 Ruta biosintética del alginato y poli-β-hidroxitirato (PHB)	11
Figura 2.4 Genes biosintéticos del poli-β-hidroxitirato	12
Figura 6.1 Estrategia experimental	22
Figura 7.1. Sistema de fermentación, control y adquisición de datos para los cultivos	25
Figura 7.2. Curva patrón para la determinación de proteína	26
Figura 7.2.3a. Curva patrón para la determinación de biomasa para la cepa ATCC 9046	27
Figura 7.2.3b. Curva patrón para la determinación de biomasa para la cepa AT6	27
Figura 7.2.6 Curva patrón para la determinación de sacarosa	29
Figura 8.1 Producción de biomasa y pH obtenido en matraces con deflectores con la mutante AT6 de <i>A. vinelandii</i>	33
Figura 8.2 Producción de biomasa y pH obtenido en matraces con deflectores con la mutante AT6 en condiciones diazotróficas	37
Figura 8.3 Producción de biomasa y pH obtenido en matraces con convencionales con la mutante AT6 en condiciones diazotróficas	39
Figura 8.4 Cultivo en lote de la mutante AT6 con diferentes fuentes de carbono	44
Figura 8.5 Cultivo en lote de la mutante AT6 en condiciones de no fijación de N ₂	48
Figura 8.6 Cultivo alimentado de la mutante AT6	52
Figura 8.7 Cultivo alimentado comparativo de cepa silvestre ATCC 9046 vs. AT6	55
Figura 8.7.1 Cinética de acumulación de poli-β-hidroxitirato (PHB)	57
Figura 8.8. Evolución del peso molecular promedio del alginato obtenido durante el cultivo alimentado	60

Figura 8.9 Distribución del peso molecular del alginato producido durante el cultivo alimentado	62
Figura 8.10 Reogramas de viscosidad del alginato producido durante el cultivo alimentado	66

Índice de tablas

	Página
Tabla 2.1. Propiedades funcionales y usos industriales de los Alginatos	9
Tabla 8.1 Concentración de ácidos orgánicos excretados por <i>A. vinelandii</i> cultivada en matraces agitados en condiciones de no fijación de nitrógeno	35
Tabla 8.2 Concentración de ácidos orgánicos excretados por <i>A. vinelandii</i> (mutante AT6) cultivada en matraces agitados en condiciones diazotróficas a baja aireación	40
Tabla 8.3. Crecimiento y pH final exhibido por la cepa mutante AT6 de <i>A. vinelandii</i> bajo diferentes condiciones de cultivos a nivel de matraces agitados	41
Tabla 8.4. Crecimiento exhibido por la cepa mutante AT6 de <i>A. vinelandii</i> bajo diferentes condiciones de cultivos a nivel fermentador	50
Tabla 8.5 Rendimiento de la fuente de carbono durante el crecimiento de <i>A. vinelandii</i> y rendimiento en la producción de alginato por unidad celular	58
Tabla 8.6 Viscosidad generada por la solución de alginato reconstituida	66

Nomenclatura

Símbolo	Significado	Unidades
ATCC	American Type Culture Collection	---
G	Ácido gulurónico	---
M	Ácido manurónico	---
MOPS	Ácido 3-N-morfolino propanosulfónico	---
PHB	Poli- β -hidroxibutirato	---
PM	Peso molecular	kDa
PMP	Peso molecular promedio	kDa
rpm	Revoluciones por minuto	min ⁻¹
TOD	Tensión de oxígeno disuelto	%
Yp/x	Rendimiento de alginato por unidad celular	g/g
Yp/x'	Rendimiento de alginato por unidad celular en la etapa de alimentación	g/g
Yp/s	Rendimiento de alginato en base a sacarosa	g/g
Yx/s	Rendimiento de biomasa en base a sacarosa	g/g
V _L	Volumen de trabajo	L
μ	Velocidad específica de crecimiento	h ⁻¹
K	Índice de consistencia	Pa s ⁿ
n	Índice de flujo	---
γ	Gradiente de deformación	s ⁻¹
τ	Esfuerzo de corte	Pa

Resumen

Azotobacter vinelandii es una bacteria Gram negativa productora de alginato. La producción de alginato por vía microbiana representa una alternativa interesante, ya que permite la producción de un polímero con una composición química uniforme, en términos de su peso molecular y su composición de bloques, el cual puede ser usado en aplicaciones industriales específicas, con el propósito de hacerlo eventualmente competitivo industrialmente.

En los últimos años se han realizados diversos estudios encaminados a la obtención y utilización de cepas genéticamente modificadas de *A. vinelandii*. La manipulación genética en *A. vinelandii*, ha permitido generar un gran número de cepas mutantes enfocadas particularmente en la producción de alginato, obteniendo así algunas variantes que presentan un mayor rendimiento por unidad celular, como en el caso de la mutante AT6, la cual es incapaz de producir poli- β -hidroxibutirato (PHB), ya que tiene una mutación en el primer gen del operón *phbBAC* que impide completamente la síntesis de PHB.

El objetivo principal del presente estudio consistió en emplear la mutante AT6, con la finalidad de alcanzar concentraciones superiores de alginato a las obtenidas hasta ahora con la cepa silvestre y de esta manera maximizar la producción del polímero. Para esto se diseñaron estrategias de fermentación en un cultivo lote alimentado.

Inicialmente, se generó una estrategia de cultivo a nivel matraz, que permitiera obtener un inóculo con una mayor concentración de células; de modo que garantizara alcanzar una mayor densidad celular en un menor tiempo durante los cultivos en fermentador. Esto permitió lograr un incremento en la producción de biomasa, obteniéndose un inóculo con una concentración de 1.6 g/L bajo condiciones de fijación de nitrógeno y de menor aireación.

Durante los cultivos en lote, se demostró que el empleo de la sacarosa como fuente de carbono permitió un mayor crecimiento de la cepa mutante AT6 a nivel de fermentador, bajo condiciones rigurosamente controladas de oxígeno disuelto y pH. El elevado valor en la TOD (10 %), aunado con una condición de no fijación de nitrógeno, permitió el uso más eficiente de la fuente de carbono para la producción de biomasa. Se demostró que a valores elevados de oxígeno disuelto, la producción de biomasa se ve incrementada. Esta condición también favoreció la síntesis de alginato.

En la etapa de alimentación, la limitación de oxígeno (cercano a cero) disminuyó considerablemente la formación de biomasa. Se logró incrementar la producción de alginato, hasta 9.2 g/L. La producción volumétrica del polímero fue mayor en comparación con lo reportado previamente en cultivos de *A. vinelandii* con la cepa silvestre y otras cepas mutantes. Durante estos cultivos se obtuvo un incremento en el peso molecular del alginato sintetizado al limitar la velocidad específica de crecimiento de *A. vinelandii*.

1 Introducción

El alginato es un copolímero lineal compuesto por monómeros de ácido β -D-manurónico y su epímero el ácido α -L-gulurónico, unidos por enlaces β 1- 4. El rango de aplicaciones de estos polímeros es cada vez más extenso, pudiendo usarse como aditivos capaces de viscosificar, estabilizar, emulsificar y gelificar soluciones acuosas (Rehm y Valla, 1997). La importancia del alginato radica en su capacidad para modificar las propiedades reológicas de los sistemas acuosos (Sutherland, 1990).

La producción de alginato, para las aplicaciones actuales, está exclusivamente basada en el cultivo de varias especies de algas cafés (*Phaeophyceae*) en las que comprende más del 40 % de la materia en peso seco. A nivel mundial, el alginato con fines comerciales alcanza un consumo cercano a 40,000 toneladas al año (Boswell, 2002). Si bien, todos los alginatos comerciales son de origen algal, resulta factible la producción del polímero procedente de fuentes bacterianas. Una gran variedad de bacterias han sido reportadas como productoras de exopolisacáridos, entre ellas *Azotobacter vinelandii*, *A. chroococcum* y varias especies de *Pseudomonas*, las cuales sintetiza el exopolisacárido alginato (Gacesa, 1998).

El interés en el alginato microbiano ha sido motivado médicamente, por el rápido desarrollo de aplicaciones farmacéuticas de ese polímero y el descubrimiento de sus propiedades inmunológicas, por lo que ha despertado el interés de la industria bioquímica en desarrollar procesos de optimización en su producción (Sabra *et al.*, 2001). Es importante señalar que los alginatos de alta calidad y pureza usados por la industria farmacéutica alcanzan precios hasta de 40,000 dólares/Kg (Rehm y Valla 1997).

Mediante el uso de cepas modificadas genéticamente se ha logrado una mejora en el rendimiento de la síntesis de alginato por unidad celular (Segura *et al.*, 2003b). Esta estrategia molecular ha permitido también, ampliar las propiedades y características químicas del biopolímero (Peña *et al.*, 2002). Otro tipo de cepas mutantes han permitido evitar efectos indeseables en la degradación del alginato, lo cual permite la síntesis de un

producto de mayor uniformidad en términos de los pesos moleculares (Trujillo-Roldán *et al.*, 2003a).

Se han realizado numerosos estudios sobre la influencia de los factores ambientales en el crecimiento de *A. vinelandii* (Annison y Couperwhite 1986; Brivonese y Sutherland 1989; Peña *et al.*, 1997; Peña *et al.*, 2000). Se sabe que uno de los parámetros críticos en la producción del alginato es la tensión de oxígeno disuelto (TOD). A una baja TOD *A. vinelandii* además de producir alginato, acumula altas concentraciones de un polímero intracelular de reserva, llamado poli- β -hidroxibutirato (PHB); a una alta TOD, la bacteria usa la fuente de carbono principalmente para la producción de biomasa. Recientemente en cultivos tipo lote alimentado, Priego-Jiménez *et al.* (2005) observaron que la velocidad específica de crecimiento (μ) juega un papel clave en la síntesis y peso molecular del alginato. Para esto, utilizaron cultivos exponencialmente alimentados para mantener los cultivos a μ controladas, demostrando que tanto el rendimiento del alginato sintetizado como su peso molecular se incrementan conforme la μ se disminuye (en un rango de 0.09 a 0.03 h⁻¹). Al parecer *A. vinelandii* sintetiza alginatos de alto peso molecular como una respuesta de adaptación a condiciones limitantes de crecimiento (Priego-Jiménez *et al.*, 2005).

Con el propósito de optimizar el proceso y entender los mecanismos moleculares para la síntesis de alginato, se han generado un gran número de cepas modificadas genéticamente de *A. vinelandii* (Galindo *et al.*, 2007). Las cepas mutantes también han permitido elucidar aspectos claves en la regulación de la biosíntesis del alginato y por lo tanto, han permitido construir cepas con una mayor producción específica de alginato. Además, esta estrategia genética ha permitido generar cepas mutantes que producen alginatos con características químicas específicas. Sin embargo, todas las mutantes previamente evaluadas producen menos alginato con respecto al producido por la cepa silvestre (Galindo *et al.*, 2007). Por esto, el objetivo del presente proyecto plantea optimizar la producción de alginato, usando una cepa mutante de *A. vinelandii* incapaz de sintetizar poli- β -hidroxibutirato, mediante el uso de cultivos alimentados.

2 Antecedentes

2.1 Generalidades

En 1881, el químico Británico Stanford fue el primero en describir la existencia del alginato en algas cafés (*Phaeophyceae*) e identificarlo como constituyente importante de las paredes celulares. Los alginatos comerciales son obtenidos principalmente de *Laminaria hyperborea*, *L. japonica*, *L. digitata*, *Ascofilium nodosum*, *Macrocistis pyrifera* y *Sargassum* spp. El alginato está compuesto por bloques de ácido β -D-manurónico y su epímero el ácido α -L-gulurónico, la composición y estructura de sus bloques puede variar de acuerdo a las condiciones ambientales; condiciones de crecimiento; la especie empleada; la técnica de extracción; y de la parte del talo de la cual el alginato es extraído (Draget *et al.*, 2001).

El alginato está presente en casi todas las especies de algas cafés, siendo rentable la extracción del polímero en aquellas especies donde el porcentaje del alginato sea mayor a un 40 % en peso (Rehm y Valla, 1997; Gacesa, 1998). La mayor producción de alginato se da en los Estados Unidos (10,000 a 12,000 ton/año), seguido de China (8,000 a 10,000 ton/año), el Reino Unido (6,000 a 8,000 ton/año), Noruega (5,000 ton/año), Francia (2,000 ton/año) y Japón (1,500 a 2,500 ton/año). De las 12,000 toneladas de alginato consumidas en los Estados Unidos, el 60 % se empleó en el sector alimentario, 20 % en el sector farmacéutico, 10 % en papel y 10 % en la industria textil (Boswell, 2002).

El alginato microbiano fue descubierto mas de 80 años después de haber sido aislado de macroalgas marinas, cuando se aisló y se caracterizó parcialmente de una cepa mucoide de *Pseudomonas aeruginosa* por Linker y Jones (1964). Este exopolisacárido ha sido ampliamente asociado con la infección crónica de pacientes con fibrosis quística en los pulmones, donde juega un papel clave como factor de virulencia. Dos años después, Gorin y Spencer (1966) demostraron que el alginato acetilado puede también ser

producido por la bacteria del suelo *A. vinelandii* como parte del proceso de enquistamiento.

2.2 Estructura y propiedades del alginato

El alginato está compuesto de ácido β -D-manurónico (M) y su epímero el ácido α -L-gulurónico (G), estos monómeros pueden estar arreglados en bloques de estructuras homopoliméricas (polimanurónico o poligulurónico) o en estructuras heteropoliméricas unidos por enlaces β 1- 4 (Fig. 2.1). La variación en la secuencia de la cadena de alginato en relación con los bloques de ácido manurónico y ácido gulurónico y su longitud, son la base de su uso industrial, las cuales determinan la capacidad de viscosificación y gelificación que son las características mas importantes desde el punto de vista comercial (Moe *et al.*, 1995; Sabra *et al.*, 2001).

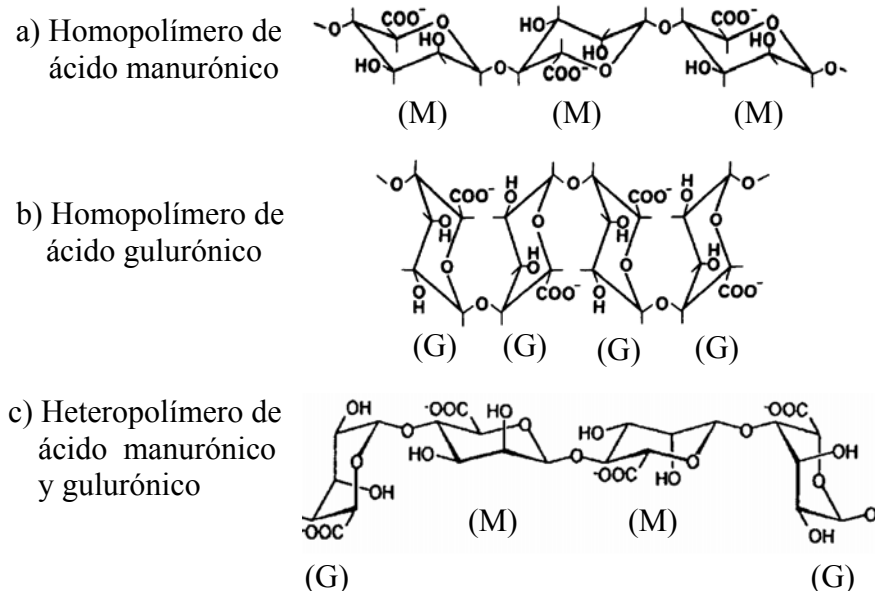


Fig. 2.1. Estructura química del alginato.

En general, el tipo de gel que se forma a partir del alginato, depende tanto del número y fuerza de las uniones entre las moléculas de alginato así como de la composición del polímero. Los alginatos que contienen secuencias de poliguluronato,

tienen alta afinidad para unirse a determinados cationes polivalentes. Tales alginatos pueden por lo tanto, formar geles rígidos en presencia de calcio (Moe et al 1995; Rehm y Valla 1997). Esto es debido al arreglo geométrico en la conformación de los bloques gulurónicos que permiten la formación de espacios huecos en la cadena, lo que ocasiona que el calcio permanezca en estas zonas de unión entre las moléculas del alginato (Fig. 2.2) formando una estructura llamada “caja de huevos”, mientras que los alginatos con secuencias polimanurónicas forman geles suaves y elásticos. Las soluciones de alginato son altamente viscosas, lo cual es causado principalmente por el grado de polimerización. La viscosidad es también dependiente del contenido y distribución de los dos monómeros en la molécula de alginato (Moe et al., 1995; Sabra et al., 2001).

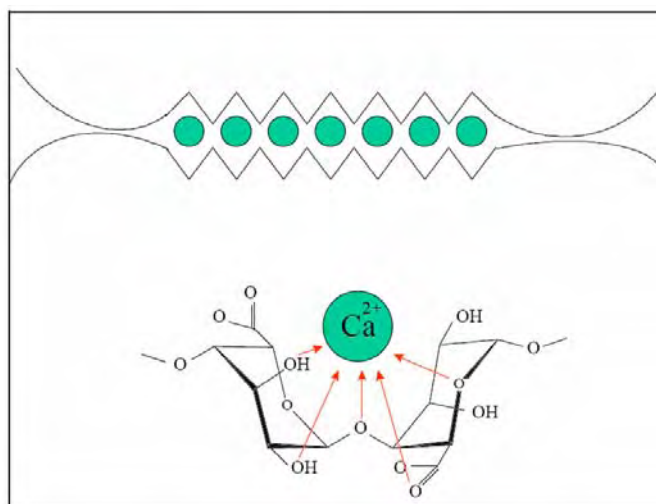


Fig. 2.2. Estructura tipo “caja de huevos” en relación con la unión de cationes divalentes a secuencias de ácido gulurónico.

Tres parámetros esenciales determinan la solubilidad del alginato. Por ejemplo una disminución en el pH del medio conduce a una precipitación del alginato en un rango estrecho, dependiendo del peso molecular del polímero. Por otra parte, al variar la fuerza iónica del medio, con la adición de altas concentraciones de sales inorgánicas, el alginato puede ser precipitado y fraccionado. Así también, el efecto de iones en la gelificación ocasiona que a concentraciones de Ca^{2+} por debajo de 3 mM, casi todo el alginato se

encuentre en solución, mientras que en concentraciones de excedentes de 3 mM el alginato se encuentre formando geles (Moe *et al.*, 1995).

2.2.1 Alginatos microbianos

La producción de alginato por vía microbiana representa una alternativa interesante, ya que permite la producción de un polímero con una composición química uniforme, en términos de su peso molecular y su composición de bloques, el cual puede ser usado en aplicaciones industriales específicas, con el propósito de hacerlo eventualmente competitivo industrialmente (Peña *et al.*, 2002).

Una gran variedad de bacterias han sido reportadas como productoras de exopolisacáridos. Las bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Azotobacter* producen el polímero alginato, el cual tiene la misma base estructural que los alginatos algales. La diferencia más relevante entre el alginato bacteriano y el algal, es que los alginatos bacterianos poseen un grupo acetilo en el carbono dos o tres del residuo munurosil, en vez de un hidroxilo, como en los alginatos algales. El grado de acetilación de los polímeros bacteriales es variable; por ejemplo, el alginato producido por *A. vinelandii* presenta, por cada 5.2 residuos de ácidos urónicos, uno acetilado (Gasesa, 1998). Los grupos acetilo están siempre asociados a los residuos de ácido manurónico (Sabra, 2001). El polímero producido por *P. aeruginosa* está únicamente constituido por residuos de L-manurónico, lo que determina en gran medida las propiedades del producto (Sutherland, 1990; Gacesa, 1998).

A diferencia del alginato algal, la producción de alginato microbiano por fermentación tiene la ventaja de una composición y un rendimiento constante (Clementi, 1997; Rehm y Valla 1997). El alginato bacteriano normalmente tiene un mayor peso molecular que el polímero algal. El peso molecular de los alginatos algales se encuentra en un rango de 48,000 a 180,000 kDa; mientras que valores de entre 176,000 y 500,00 kDa se han encontrado para los alginatos de *P. fluorescens*. Valores similares también han sido reportados para *P. aeruginosa*, además de que éstos alginatos muestran una

menor polidispersión, a diferencia del material algal (Clementi, 1997). El alto peso molecular del alginato bacteriano y su carga negativa permiten que se encuentre altamente hidratado, lo cual contribuye a la viscosidad (Gacesa, 1998). Por esta razón, la producción de alginatos bacterianos ha sido estudiada bajo condiciones controladas de cultivo. La variación en el peso molecular, los bloques estructurales y la acetilación afectan en gran medida las propiedades fisicoquímicas y reológicas del polímero. La base biológica para esta variabilidad es consecuentemente de importancia científica y funcional. (Smidsrod y Draget, 1996).

La especie *A. vinelandii* parece ser la mejor candidata para la producción industrial de alginato, debido a la composición química y distribución de pesos moleculares de su alginato, los cuales definen su aplicación y son especialmente requeridos en los campos biotecnológicos, biomédicos y farmacéuticos, además de que es una bacteria no patógena (Clementi, 1997).

2.2.2 Aplicaciones comerciales del alginato

El mercado de los alginatos requiere de productos cuyas propiedades reológicas y características gelificantes, cubran un amplio margen, ya que esto determina su aplicación específica (Moe *et al.*, 1995). Los alginatos comerciales son utilizados principalmente como aditivos para gelificar, emulsionar, estabilizar o viscosificar soluciones acuosas (Rehm y Valla, 1997).

El rango de aplicaciones de estos polímeros es cada vez más extenso. Son ampliamente usados en la industria alimentaria, farmacéutica y biotecnológica. En la industria de alimentos, el alginato no contribuye al valor nutritivo, debido que los humanos no lo metabolizan, además de no impartir sabor ni olor a los productos finales. Una de las aplicaciones biotecnológicas de los alginatos, es su uso en la inmovilización de células vivas de diferentes tipos, tales como levaduras para la producción de etanol o la producción de anticuerpos monoclonales en células de hibridomas (Crecenzi, 1995; Clementi, 1997).

En la medicina, los alginatos de alta calidad se usan para el tratamiento experimental de diabetes tipo I, por inmovilización de células β del páncreas (las cuales producen insulina) en cápsulas de alginato, las cuales funcionan como páncreas artificial (Sabra *et al.*, 2001). Son útiles para prevenir las úlceras, debido a que en presencia de ácido, son insolubles, formando por lo tanto una capa protectora en el estómago (Crescenzi, 1995; Gacesa, 1998). Los alginatos también estimulan el sistema inmunológico a través de células inmunes (monocitos) las cuales secretan citocinas, por ejemplo, factores α de necrosis tumoral (TNF - α) e interleucinas (IL-1) (Otterlei *et al.*, 1991). La respuesta del sistema inmune es dependiente de la estructura del alginato; mientras que los bloques gularónicos no parecen tener efecto estimulante, los residuos manurónico del polímero dan la mayor respuesta (Skjak y Braek, 1992). Un resumen de las aplicaciones más representativas puede verse en la tabla 2.1

Tabla 2.1. Propiedades funcionales y usos industriales de los alginatos.

INDUSTRIA	USO	PRODUCTOS
Alimentos	Estabilizador de emulsiones	Helados, gelatinas, rellenos para panificación, cubierta de embutidos, salsas y aderezos. Productos enlatados. Congelados y deshidratados
	Agente gelificante	
	Espesante	
Farmacéutica	Estabilizador de espuma	Jabones y lociones. Tabletas. Vendajes quirúrgicos. Ungüentos y antibióticos.
	Emulsificante y espesante	
	Agente desintegrador	
	Gel absorbente	
Agricultura	Agente de suspensión	Acondicionador de suelos
	Agente de retención de agua	
Papel	Agente de suspensión	Corte y dimensionamiento de papel
Textil	Espesante y gelificante	Impresión de géneros
Otras industrias	Agente gelificante	Explosivos (geles de alginato de borato) Odontología (impresiones dentales) Juguetería (moldes) Fotografía (endurecimiento de geles) Tratamiento de aguas (agente floculante) Biocatalizadores (inmovilización de células y enzimas)

Tabla editada de López-Munguía y colaboradores (1993) y de Gacesa (1998).

2.3 Biosíntesis del alginato.

Pindar y Bucke (1975) determinaron la secuencia de reacciones que intervienen en la producción de alginato en *A. vinelandii* mediante la alimentación de intermediarios radioactivos y detectaron la actividad individual de las enzimas involucradas en la ruta biosintética.

Como se presenta en la figura 2.3, la sacarosa es hidrolizada liberando glucosa y fructosa, luego de formarse las 2 hexosas-6-fosfato correspondientes, tiene lugar la formación de manosa-1-fosfato por la acción de la enzima fosfomanosa isomerasa. La manosa-1-fosfato es esterificada con GTP por acción de la enzima GDP manosa pirofosforilasa, para obtener GDP-manosa. Por acción de la GDP-manosa deshidrogenasa se obtiene GDP-ácido manurónico. El ácido manurónico es el sustrato que se polimeriza a nivel de la membrana interna, para formar ácido polimanurónico (Pindar y Buck, 1975; Espín, 2002). El polímero es exportado fuera de la célula donde algunos residuos de manurónico no acetilados son epimerizados a residuos gularónicos por múltiples epimerasas extracelulares, dando así el producto final del alginato (Ertesvag et al., 1995).

2.4 Biosíntesis del poli- β -hidroxibutirato (PHB)

El poli- β -hidroxibutirato (PHB) es un polímero compuesto por monómeros de β -hidroxibutirato. En *A. vinelandii*, la fuente de carbono puede ser utilizada para la síntesis de alginato o para la acumulación del polihidroxibutirato (PHB), como se muestra en la figura 2.3. En *A. vinelandii* están presentes tres actividades enzimáticas que llevan a cabo la biosíntesis de PHB. El primer paso de la vía consiste en la condensación de dos moléculas de acetyl-CoA, catalizada por la enzima β -cetotiolasa, para generar acetoacetyl-CoA. Este último es reducido por una acetoacetyl-CoA reductasa, utilizando NADPH y produciendo β -hidroxibutiril-CoA. Finalmente, las unidades de β -hidroxibutirato son polimerizadas por la PHB sintasa (Anderson y Dawes, 1990).

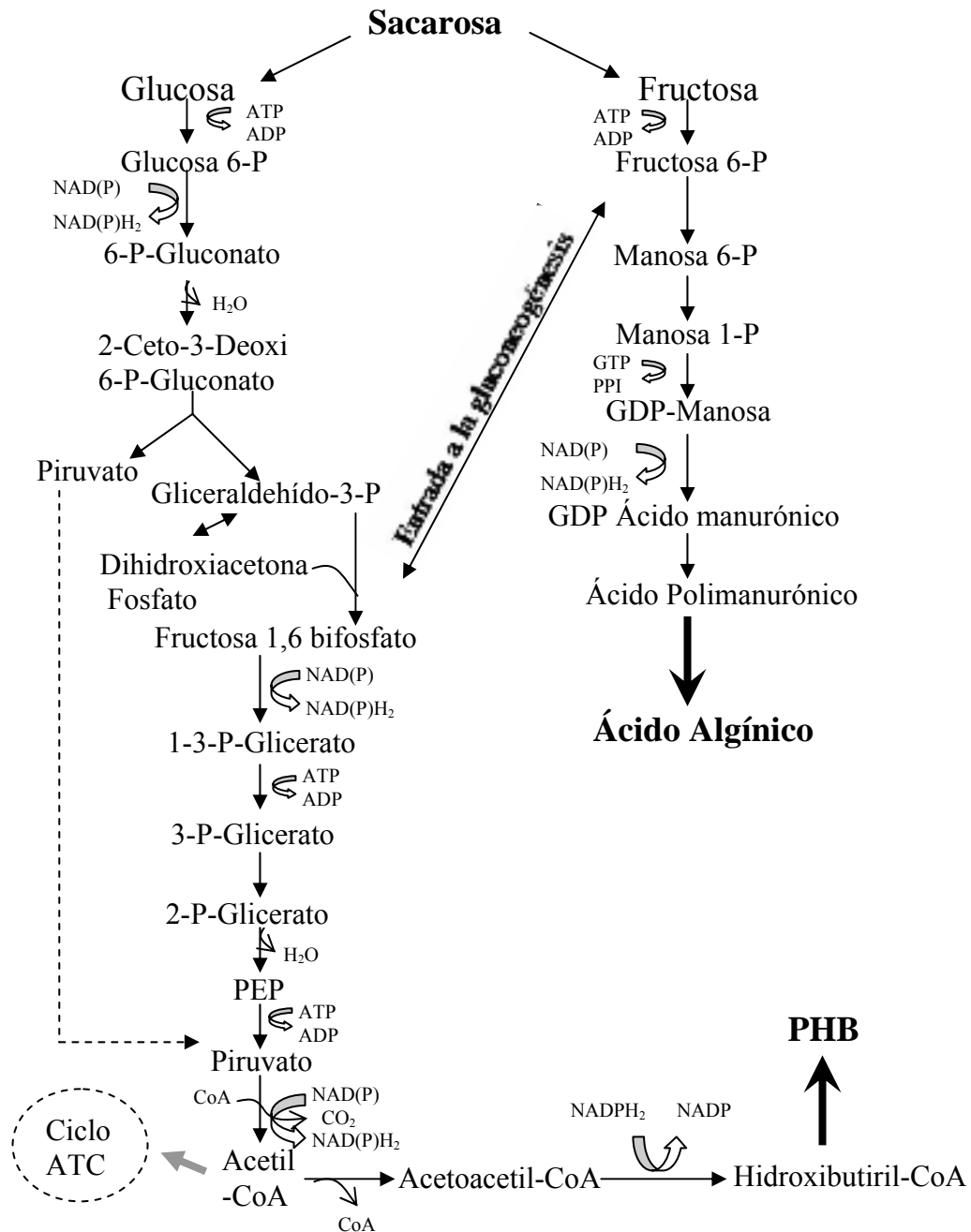


Fig. 2.3. Ruta biosintética del alginato y del poli-β-hidroxibutirato (PHB) en *A. vinelandii* (Sabra *et al.*, 2001).

2.4.1 Genes de la biosíntesis del poli-β-hidroxibutirato

En *A. vinelandii*, se han identificado los genes que codifican para las enzimas que participan en la síntesis de PHB. Los genes que codifican para estas enzimas están

incluidas en el operón *phbBAC* (Segura *et al.*, 2003a). Uno de estos genes, *phbA*, codifica para la β -cetotiolasa específica para la síntesis de PHB (Segura *et al.*, 2000). Los genes *phbB* y *phbC* codifican para la segunda y tercera enzima de la vía (Fig. 2.4) (Espín 2002).

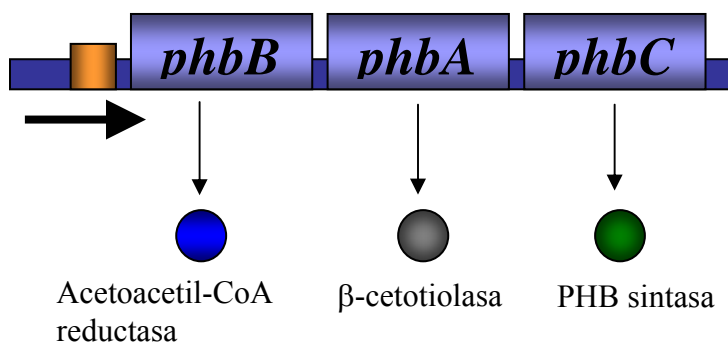


Fig. 2.4. Genes y enzimas involucradas en la síntesis del polihidroxibutirato (PHB) en *A. vinelandii*.

2.4.2 Función biológica poli- β -hidroxibutirato

En general, en las bacterias productoras de PHB, se presenta la acumulación del polímero en respuesta a una limitación para su crecimiento, principalmente por la falta de algún nutriente como nitrógeno, fósforo, magnesio u oxígeno y en presencia de un exceso de fuente de carbono y energía, ya que este polímero tiene la función de almacenar grandes cantidades de carbono reducido en forma de gránulos intracelulares insolubles, sin afectar la presión osmótica de la célula (Anderson y Dawes, 1990).

Otro papel propuesto para el PHB es el de regulador de los equivalentes de reducción intracelulares. Cuando en la célula se presenta una condición de baja concentración de oxígeno (como la requerida para la fijación de nitrógeno) y existe una concentración de carbono alta, se favorece la acumulación de NADH y NADPH. Estos metabolitos inhiben varias enzimas del catabolismo de glucosa y del ciclo de Krebs (Senior *et al.*, 1972). En estas condiciones se sintetiza el PHB. Se ha propuesto que la síntesis de este polímero permite regular la concentración de los reductores, ya que

almacena electrones durante su síntesis, previniendo la generación de una concentración alta de NAD(P)H y permitiendo el funcionamiento de vías metabólicas oxidativas, aun a concentraciones bajas de oxígeno celular (Senior *et al.*, 1972).

2.5 Producción de alginato por vía fermentativa

En los últimos años se han llevado a cabo numerosos estudios sobre la influencia de diversos factores ambientales en la producción de alginato por *A. vinelandii*. Se ha estudiado el efecto de los nutrientes, la temperatura de cultivo, pH y los efectos de la concentración de oxígeno disuelto (Annison y Couperwhite 1986; Brivonese y Sutherland 1989; Peña *et al.*, 1997; Peña *et al.*, 2000). De toda la gama de factores estudiados en el cultivo de *A. vinelandii*, se sabe que uno de los parámetros críticos en la producción del alginato es la tensión de oxígeno disuelto (TOD). En los estudios previos (Peña *et al.*, 2000; Sabra *et al.*, 2000) se encontró que *A. vinelandii* produce eficientemente alginato en niveles de oxígeno entre 3 y el 5 % de la TOD. Por debajo de estos valores, la bacteria además de producir alginato, acumula altas concentraciones de PHB. También se ha demostrado que las características químicas del alginato están fuertemente influenciadas por este parámetro (Peña *et al.*, 2000; Trujillo-Roldán *et al.*, 2001b).

Peña *et al.* (1997) generaron información sobre el efecto de la aireación y las condiciones hidrodinámicas sobre la producción y peso molecular de los alginatos en los cultivos de *A. vinelandii*. Ellos llevaron a cabo cultivos de *A. vinelandii* en matraces con deflectores (con tres mamparas o baffles), donde las bacterias crecieron casi al doble y produjeron tres veces menos alginato que aquellos cultivos llevados a cabo en matraces convencionales (de baja oxigenación). Las viscosidades más altas fueron aquellas de los cultivos en matraces convencionales (520 cps) con respecto a los matraces con deflectores (30 cps). Este último fenómeno estuvo relacionado con un cambio en las características moleculares del polímero, y puede estar relacionado a la sensibilidad frente al oxígeno de las enzimas clave en la biosíntesis del alginato (Peña *et al.*, 1997). Horan *et al.* (1983) encontraron que las actividades de la fosfomanosa isomerasa y la

GDP-manosa pirofosforilasa se incrementan en concentraciones de 1 y 5 % de la saturación y su actividad decrece a mayores niveles de oxígeno.

Posteriormente, en cultivos en fermentador, Peña *et al.*, (2000) reportaron como la TOD (en el intervalo de 0.5 a 5 %) y la hidrodinámica (velocidades de agitación en el intervalo de 300 a 700 rpm) afectaban la producción de alginato, así como el peso molecular del polímero. En condiciones de baja velocidad de agitación (300 rpm) y una TOD alta (5 %), el cultivo produjo más alginato (4.5 g/l) que lo obtenido a la misma agitación pero a una TOD de 0.5 % (1.0 g/l). Por otra parte, los valores más altos de peso molecular del alginato se obtuvieron a velocidades bajas de agitación manteniendo constante la tensión de oxígeno disuelto. En el mismo estudio se reportó que, en los tiempos finales de los cultivos, se observó depolimerización del alginato, la cual fue causada por la actividad de alginato-liasa extracelular (Peña *et al.*, 2000).

2.6 Uso de cepas mutantes en la producción de alginato

El empleo de cepas mutantes de *A. vinelandii* ha permitido incrementar los rendimientos en la síntesis de alginatos, así como la obtención de polímeros con diferentes características químicas. Tal es el caso de la cepa DM, la cual presenta una mutación en el gen *phbR* (que codifica para el activador transcripcional del operón biosintético *phbBAC*) y en *muc26*, gen cuya inactivación provoca un incremento en la transcripción del gen *algD* (que codifica para una enzima clave en la biosíntesis del alginato). Esta cepa exhibió pesos moleculares considerablemente altos en relación con la cepa silvestre (Peña *et al.*, 2002). A pesar de que aun cuando no hay una explicación clara al respecto, el efecto observado es un indicio de la complejidad en la regulación de la polimerización del alginato producido por *A. vinelandii*. Por lo que, es necesario realizar mas estudios que permitan elucidar a detalle como el peso molecular del polímero es regulado.

El alginato producido por la cepa silvestre (ATCC9046) se degrada hacia el final del cultivo, lo cual constituye una situación indeseable en términos del potencial de

aplicación del alginato. Se sabe que el producto de *algL* posee actividad de alginato liasa (Llorette *et al.*, 1999). Debido a lo anterior, se construyó la cepa SML2, que lleva una mutación no polar en *algL* y por lo tanto, la actividad alginato liasa no fue detectada en la mutante SML2. Bajo una tensión de oxígeno disuelto constante de 3 %, se obtuvieron valores altos en el peso molecular del alginato (1,240 kDa) con la cepa SML2, en comparación con la cepa parental ATCC9046 (680 kDa) (Trujillo-Roldán *et al.*, 2003a).

2.6.1 Mutante AT6 de *A. vinelandii*

A. vinelandii produce dos polímeros, el PHB y el polisacárido alginato. En *A. vinelandii* la fuente de carbono puede ser convertida a PHB y alginato; sin embargo, la síntesis del PHB constituye un derroche de la fuente de carbono cuando se busca optimizar la producción del exopolisacárido alginato (Byrom 1987).

El contenido de PHB en *A. vinelandii* puede comprender cerca del 70 % del peso celular seco en ciertas cepas. Peña *et al.* (1997) reportaron que *A. vinelandii* (ATCC9046) produce 4.5 g/L de alginato y acumula arriba del 50 % del PHB en peso celular seco al final de la fermentación, cuando la bacteria es crecida en matraces agitados. Como la acumulación del PHB y la secreción del alginato están asociados a un proceso de enquistamiento, resulta difícil separar la síntesis de estos polímeros únicamente con la manipulación de las condiciones ambientales. Sin embargo, esto es posible mediante la interrupción de la síntesis de PHB por una mutación, superando uno de los obstáculos para la producción de alginato por *A. vinelandii*.

En *A. vinelandii*, cepas mutantes afectadas en el gen *phbA* son todavía capaces de producir cerca de un 5 % del PHB producido por la cepa silvestre (Segura *et al.*, 2000); mientras que, mutaciones en los genes *phbB* o *phbC* impiden totalmente la síntesis de PHB (Segura *et al.*, 2003a).

Segura *et al.* (2003b) evaluaron la producción de alginato en la cepa mutante AT6 la cual lleva una mutación (inserción) en el primer gen del operón *phbBAC* que impidió

completamente la síntesis de PHB. La inserción fue polar sobre la transcripción de los genes *phbA* y *phbC*, y dió como resultado un aumento significativo en la producción de alginato en matraces agitados. Sin embargo, la mutación tuvo un efecto negativo en el crecimiento celular. Invariablemente, cuando se cultivan cepas mutantes de *A. vinelandii* que sobreproducen alginato, se obtienen μ mas bajas que las que se obtienen con la cepa silvestre. El crecimiento pobre es característico de cepas que sobreproducen alginato (Núñez *et al*, 2000), presumiblemente debido al costo energético impuesto por la producción de altas cantidades de este polímero.

Cevallos *et al.* (1996) reportaron que una mutación en el gen *phbC* bloqueó la síntesis de PHB en *Rhizobium etli* lo cual trajo como resultado la excreción de grandes cantidades de ácidos orgánicos y aminoácidos. Estos metabolitos también fueron encontrados intracelularmente, pero fueron insignificantes comparados con la gran cantidad de estos metabolitos excretados al medio (576 veces más que en el interior celular). Otra diferencia importante entre la cepa mutante y la cepa silvestre fueron las concentraciones del poder reductor. La relación de NAD^+/NADH fue varias veces menor en la cepa mutante. El efecto de la mutación en la síntesis de PHB promovió un desarrollo de metabolismo fermentativo.

En estudios recientes sobre la producción de alginato por cepas mutantes, se reporta (Mejía, 2004), que la cepa mutante AT6 de *A. vinelandii* (no productora PHB), fue incapaz de crecer en medio Burk modificado (con suministro de extracto de levadura) en cultivos sumergidos a nivel de matraces agitados. Lo anterior fue ocasionado por una caída drástica del pH en el medio de cultivo, que podría estar relacionado con la excreción de ácidos orgánicos durante las primeras horas del cultivo. Sin embargo, cuando la cepa mutante fue cultivada en matraces bajo condiciones controladas de pH en el medio de cultivo, se promovió el crecimiento de la mutante y con ello el rendimiento de alginato por unidad celular. También, se observó crecimiento cuando la mutante fue cultivada en un medio sólido conteniendo un medio de cultivo carente de fuente de nitrógeno. Sin embargo, a pesar del control en el pH para el caso de los cultivos a nivel de matraces, se obtuvo una concentración celular menor a la observada con la cepa

parental (ATCC9046) y por lo tanto, la concentración de alginato fue también baja (Mejía, 2004).

2.7 Cultivos alimentados

Un cultivo alimentado es definido como un sistema donde uno o más nutrientes son suministrados al biorreactor durante el tiempo del cultivo y los productos y demás componentes se mantienen dentro del sistema, hasta el final de la corrida (Yamane y Shimizu, 1984). Es decir, existe un flujo de entrada pero no uno de salida y el volumen cambia con respecto al tiempo. Existen muchas modalidades de cultivos alimentados, además, es posible alimentar uno o varios componentes del medio de cultivo. La alimentación en forma exponencial tiene un gran atractivo ya que el proceso se aproxima al comportamiento de un sistema continuo (quimioestado) (Yamane y Shimizu, 1984).

Los cultivos alimentados son una herramienta usada en el área de la producción de polímeros y metabolitos secundarios de origen microbiano. Estos cultivos alimentados conteniendo una concentración alta de fuente de carbono, son empleados comúnmente para lograr una densidad celular alta y una elevada concentración del metabolito de interés. Por ejemplo Merritt *et al* (2000) reportaron la producción de poliribosilribitolfosfato en *Haemophilus influenzae* utilizando este tipo de cultivos, observando una maximización en el crecimiento celular y en la producción del poliribosilribitolfosfato. Es importante señalar también, que los cultivos lote alimentado, son opciones útiles en el control de cultivos a bajas velocidades de crecimiento, condición que en varios procesos biológicos, ha permitido el incremento en la producción de varios metabolitos de interés (Ramírez *et al.*, 1994; Youssef *et al.*, 1999).

En estudios previos con *A. vinelandii* (Priego-Jiménez *et al.*, 2005) se evaluó el efecto de la μ en relación con el rendimiento de alginato por unidad celular y su peso molecular. Para esto utilizaron un cultivo exponencialmente alimentado para mantener los cultivos a μ controladas, en rangos de 0.09, 0.06 y 0.03 h⁻¹. Con lo cual demostraron que tanto el rendimiento del alginato sintetizado como su peso molecular se incrementan

conforme la μ se disminuye, y este efecto fue particularmente pronunciado a velocidades específicas de crecimiento por debajo de 0.09 h^{-1} .

El peso molecular obtenido a una μ de 0.03 h^{-1} fue 15 veces mayor (1300 kDa) a los obtenidos en cultivos en lote (95 kDa). A la menor μ que se probó (0.03 h^{-1}), el rendimiento de alginato por unidad celular fue cerca de dos veces mayor que el observado a una μ de 0.06 h^{-1} . Este estudio demostró que tanto el peso molecular del alginato bacteriano como su rendimiento pueden ser maximizados a través de una estrategia sobre el control del crecimiento. Esto sugiere que las estrategias de cultivo que minimicen μ , maximizarán la producción de alginato. Al parecer *A. vinelandii* sintetiza alginatos de alto peso molecular como una respuesta de adaptación a condiciones limitantes de crecimiento (Priego-Jiménez *et al.*, 2005).

3 Justificación

En los últimos años se han realizado diversos estudios encaminados hacia la obtención y utilización de cepas genéticamente modificadas de *A. vinelandii*. Las modificaciones genéticas en *A. vinelandii* enfocadas particularmente hacia la producción de alginato, han permitido identificar algunos factores que afectan la polimerización. Esta estrategia genética ha permitido construir cepas mutantes con un mayor rendimiento en la síntesis de alginato por unidad celular. Sin embargo, la producción volumétrica de alginato no incrementó significativamente debido a que las mutaciones tienen un efecto negativo en el crecimiento celular (Galindo *et al.*, 2007). Invariablemente, cuando se cultivan cepas mutantes de *A. vinelandii* que sobreproducen alginato, se obtienen μ más bajas que las que se obtienen con la cepa silvestre. Por lo que todas las mutantes evaluadas producen una menor concentración de alginato con respecto al producido por la cepa silvestre. Por esto, en el presente trabajo se planteó maximizar la producción de alginato, así como su peso molecular, empleando una cepa mutante de *A. vinelandii* incapaz de sintetizar poli- β -hidroxibutirato. Para lo cual se desarrolló una estrategia de fermentación que permita alcanzar concentraciones superiores de alginato mediante un cultivo lote alimentado.

4 Hipótesis

El cultivo de una cepa mutante de *A. vinelandii* no productora de PHB en un sistema lote alimentado permitirá incrementar la concentración de alginato sin detrimento del peso molecular.

5 Objetivo general

Maximizar la producción del alginato sintetizado por una cepa mutante de *A. vinelandii* alterada en la síntesis de PHB, mediante el control de pH, oxígeno disuelto, nutrientes y agitación en un cultivo lote alimentado.

5.1 Objetivos particulares

- Implementar una estrategia de fermentación en lote que permita favorecer el crecimiento celular de la mutante AT6 de *A. vinelandii*.
- Establecer las condiciones ambientales que permitan maximizar la producción del alginato sintetizado por la cepa mutante AT6 de *A. vinelandii* en un cultivo lote alimentado.
- Caracterizar la composición química y reológica del alginato sintetizado por la cepa mutante.

6 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

El objetivo del presente proyecto plantea maximizar la producción de alginato en un cultivo lote alimentado a través del uso de una cepa mejorada genéticamente y mediante la manipulación de las condiciones de fermentación. Para lo cual se propuso la siguiente estrategia experimental (Fig. 6.1).

En una primera etapa, se planteó favorecer un mayor crecimiento bacteriano mediante la implementación de modificaciones en las condiciones de fermentación, las cuales permitan maximizar el crecimiento. Debido a que la caída de pH durante las primeras horas del cultivo es responsable del crecimiento pobre que experimenta la cepa mutante (Mejía, 2004), en estas fermentaciones se controló el pH continuamente. *A. vinelandii* puede ser cultivada en una gran variedad de fuentes de carbono como glucosa, fructosa, maltosa, sacarosa, manitol, glicerol y sorbitol. De estos azúcares, se ha encontrado que la fructosa y el glicerol promueven el crecimiento celular, pero son poco efectivos para la producción de alginato (Horan *et al.*, 1981).

Durante la primera etapa se cultivó a la bacteria empleando diferentes fuentes de carbono como son sacarosa, glucosa y glicerol, debido a que se ha observado que durante el crecimiento en lote empleando glicerol en un medio rico en fosfatos, *A. vinelandii* usa la fuente de carbono predominantemente en la producción de biomasa y se genera una menor concentración de alginato (Horan *et al.*, 1983). Así mismo, se modificó la aireación y el mezclado, los cuales son fundamentales para el suministro adecuado de oxígeno, con el fin de satisfacer los requerimientos metabólicos específicos para que el crecimiento bacteriano se vea favorecido, independientemente de la producción de alginato. Se sabe que la tensión de oxígeno disuelto (TOD) y la agitación son parámetros clave en los cultivos de *A. vinelandii*. Se ha determinado que a valores superiores del 5 % de TOD el crecimiento de la bacteria se favorece (Peña *et al.*, 2000).

En una segunda etapa, cuando el crecimiento celular de la cepa mutante fue considerable, se modificaron las condiciones durante el transcurso del cultivo, de modo

que favoreció la producción del alginato en lugar de la producción de biomasa. Esto se logró cambiando la TOD entre 0 y 1 % y la velocidad de agitación del cultivo a 300 rpm, en donde se ha observado que se favorece la producción del alginato (Peña *et al.*, 2000). Durante esta fase, se alimentó mediante un pulso el sustrato (sacarosa a una concentración de 20 g en un volumen pequeño de 50 ml a fin de evitar la dilución del cultivo) y nutrientes (a la misma concentración descrita en la sección 7.1 de Materiales y Métodos). También se redujo la velocidad específica de crecimiento (μ) mediante el control en la TOD, esto con el propósito de someter *A. vinelandii* a condiciones que limiten su crecimiento, en donde previamente se había observado un mayor rendimiento en la síntesis de alginato y un peso molecular máximo (Priego-Jiménez *et al.*, 2005).

Una vez concluida la segunda parte, se procedió a analizar las características químicas de alginato obtenido por la cepa mutante de *A. vinelandii*, las cuales determinan las propiedades funcionales del biopolímero.

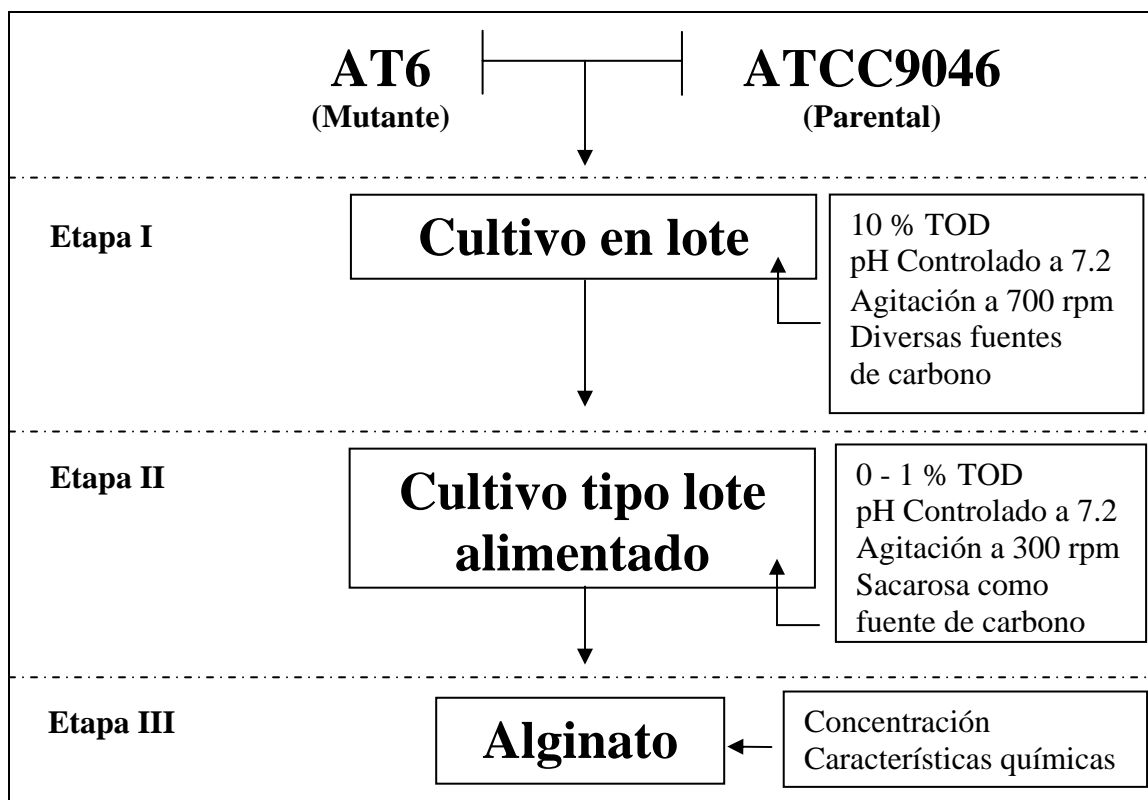


Figura 6.1. Estrategia experimental.

7 Materiales y Métodos

7.1 Microorganismos, medio de cultivo y condiciones de crecimiento

La cepa silvestre de *A. vinelandii* ATCC 9046 y la mutante AT6 que posee una mutación en el primer gen del operón *phbBAC* que impide completamente la síntesis de PHB (Segura *et al.*, 2003a), se preservaron a 4°C en tubos inclinados (slants) con medio Burk modificado solidificado con agar (18 g L⁻¹), sin extracto de levadura. El mantenimiento se realizó con resiembras mensuales, como ha sido descrito previamente (Peña *et al.*, 1997).

Los microorganismos se crecieron en medio Burk modificado (Peña *et al.*, 1997) con la siguiente composición (g L⁻¹): sacarosa (20); extracto de levadura (3); K₂HPO₄ (0.66); KH₂PO₄ (0.16); MOPS (1.42); CaSO₄ (0.05); NaCl (0.2); MgSO₄ • 7H₂O (0.2); NaMoO₄ • 2H₂O (0.0029); FeSO₄ • 7H₂O (0.027); las fuentes de carbono alternas glicerol (20); glucosa (20). Las sales de potasio, la sacarosa, el extracto de levadura y el MOPS se disolvieron en 900 ml de agua destilada y se ajustó el pH a 7.2 con NaOH (2N). A su vez, el sulfato de calcio se disolvió en 50 ml de agua destilada y las sales restantes en el mismo volumen de agua destilada. Con el objeto de evitar precipitaciones, las tres fracciones se esterilizaron por separado a 121°C durante 20 min y ya estériles se mezclaron en la campana de flujo laminar. Para preparar cajas Petri con medio sólido, se utilizó el medio previamente descrito con agar (18g L⁻¹)

7.1.2 Inóculo

Para la obtención de los inóculos, se resembró, de los tubos inclinados a medio sólido (cajas Petri) y se incubó a 29 °C durante 72 h. Tres asadas de las células de las placas fueron usadas para inocular los matraces, los cuales se incubaron durante 48 h a 29 °C y una velocidad de agitación de 200 rpm. Las células así obtenidas se utilizaron para la preparación del inóculo en fermentador. La cantidad de inóculo fue la necesaria para obtener una densidad óptica de 0.1, medida a 540 nm en un espectrofotómetro Beckman

modelo DU 650. Estos cultivos fueron inoculados con células lavadas, debido a que se ha demostrado que inóculos con componentes del medio de cultivo agotado tienen un papel regulador en la biosíntesis del alginato, mientras que los inóculos con células lavadas permiten que los estudios sean conducidos de una forma más controlada y que los datos obtenidos puedan ser mejor interpretados, tal y como lo reporta Trujillo-Roldán *et al.* (2003b).

7.1.3 Cultivos en lote

Los cultivos en lote y alimentados fueron realizados en un fermentador Applikon (Holland) de 3 L, con un volumen de trabajo (V_L) de 2 L, equipado con dos turbinas Rushton (diámetro impulsor/diámetro tanque = 0.35), de 6 paletas planas y un difusor de 7 orificios para efectuar aireación por burbujeo. El pH se controló a 7.2 de forma *on-off*, adicionando automáticamente NaOH 4 N, usando un amplificador-controlador de pH (Applikon, ADI 1010) ayudado de una bomba peristáltica. La tensión de oxígeno disuelto (TOD) fue determinada mediante un electrodo polarográfico de oxígeno (Metter-Toledo, Columbus OH). La señal fue transmitida a un amplificador de oxígeno (Applikon, ADI 1025) y adquirida por una PC (Compaq Deskpro). La TOD se controló en línea usando un programa de escrito en *Bioexpert NT*. La TOD se mantuvo a 10 % mediante la manipulación de la presión parcial de nitrógeno y oxígeno en la alimentación, a través de controladores de flujo másico (Applikon, ADI 1026) y usando un algoritmo de control proporcional-integral-derivativo (PID). Los cultivos se desarrollaron a 29 °C usando una velocidad de agitación de 700 rpm.

7.1.4 Cultivos alimentados

Los cultivos alimentados (CA) se realizaron en el mismo sistema previamente descrito, con la incorporación de un compartimiento en donde se almacenó el sustrato para la alimentación (sacarosa a una concentración de 20 g en un volumen relativamente pequeño de 50 ml a fin de evitar la dilución del cultivo y nutrientes a la misma concentración descrita en la sección 7.1 de Materiales y Métodos). Los cultivos

alimentados se realizaron en un biorreactor de 3 L entre 0 y 1 % de TOD constante, 300 rpm y 29 °C. En la figura 7.1 se describe el sistema de fermentación utilizado para el desarrollo de los cultivos. Estos cultivos se iniciaron con una etapa en lote, prosiguiendo con la etapa de alimentación. Para la adición de la sacarosa y nutrientes se utilizó una bomba peristáltica (Applikon, ADI 1025), la alimentación se realizó de forma manual. El biorreactor fue operado con un V_L de 2 L.

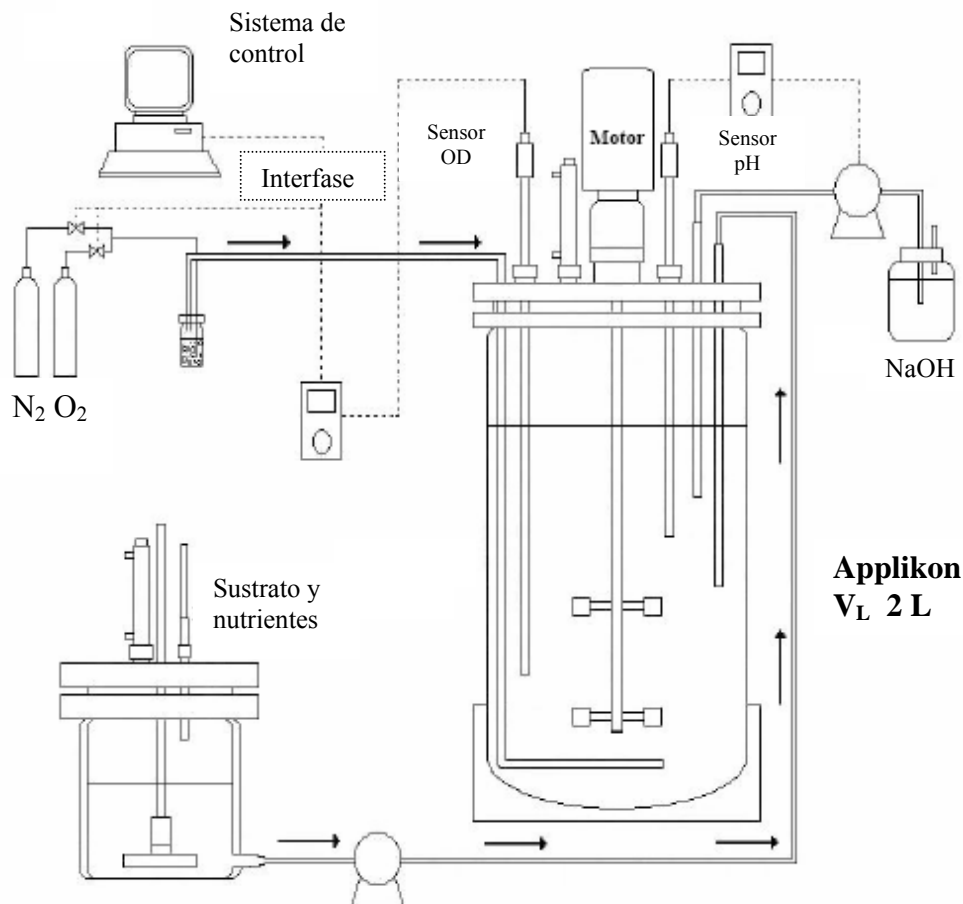


Figura 7.1. Sistema de fermentación, control y adquisición de datos para los cultivos

7.2 Métodos analíticos

7.2.1 Determinación de biomasa

La determinación de biomasa se llevó a cabo midiendo la concentración de proteína (el 50 % del peso seco de la bacteria corresponde a la concentración de proteína para el

caso de la mutante AT6), usando el método de Bradford (Bradford, 1976) mediante el *kit* de Bio-Rad (California, USA). El azul de Coomassie se une primordialmente a aminoácidos básicos y aromáticos de una proteína, especialmente a las fenilalaninas y tirosinas. Este es un procedimiento simple y exacto para determinar la concentración de la proteína. Implica la adición de un colorante ácido a la solución de la proteína y la medida a 595 nm en un espectrofotómetro. La comparación en una curva patrón proporciona una medida relativa de la concentración de la proteína. La curva patrón se elaboró utilizando soluciones de albúmina serica bovina en concentraciones de 0.05, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/ml (Fig. 7.2).

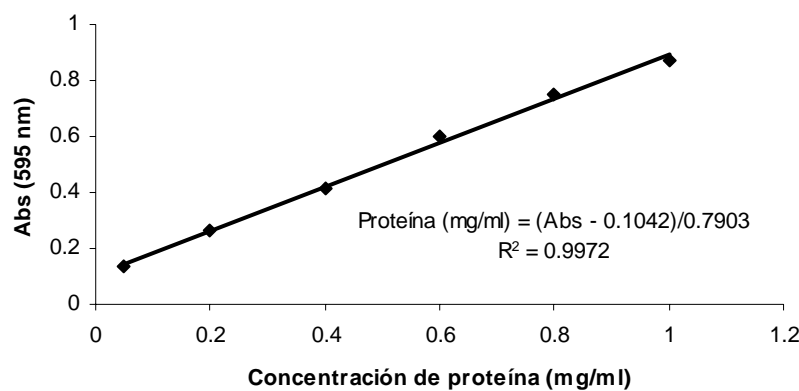


Figura 7.2. Curva patrón para la determinación de proteína.

7.2.2 Determinación de biomasa por gravimetría

La determinación de biomasa se llevó a cabo por un método gravimétrico de peso seco previamente descrito (Peña *et al.*, 1997). Se mezclaron 10 ml de caldo de cultivo con 1.0 ml de Na₂EDTA (0.1 M) y 1.0 ml de NaCl (1.0 M). Se centrifugó a 11,000 rpm durante 20 min. Se separó el sobrenadante y posteriormente el paquete celular fue filtrado al vacío a través de membranas *Nudeopore* de 0.45 μ m de tamaño de poro, previamente taradas. La membrana se puso a secar por 24 h a 70 °C en estufa (Felisa), para finalmente pesarse y obtener (por diferencia de peso) la cantidad de biomasa (g L^{-1}).

7.2.3 Determinación de biomasa por turbidimetría

Se tomó una alícuota de 1.0 ml del caldo de fermentación y se diluyó 1/50 con agua destilada. Posteriormente, se leyó la absorbancia de la muestra a 540 nm en un espectrofotómetro Beckman modelo DU 650. Los valores se usaron como una manera rápida de determinar el crecimiento bacteriano en el medio, extrapoliéndolos en una curva patrón (Peña, 1998). En las figuras 7.2.3a-7.2.3b se muestran las curvas patrón para las diferentes cepas de *A. vinelandii* utilizadas

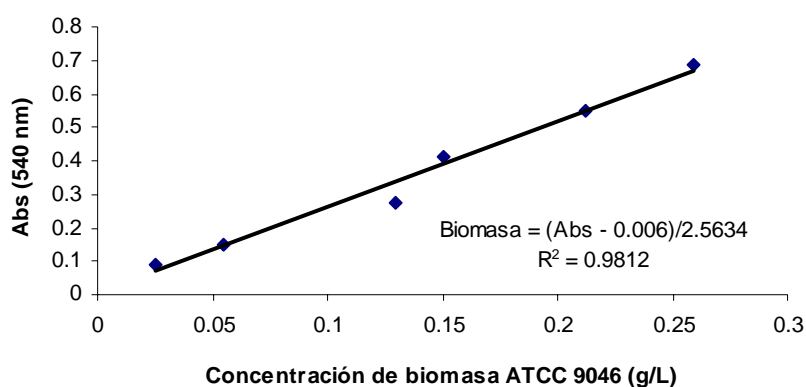


Figura 7.2.3a. Curva patrón para la determinación de biomasa para la cepa ATCC 9046.

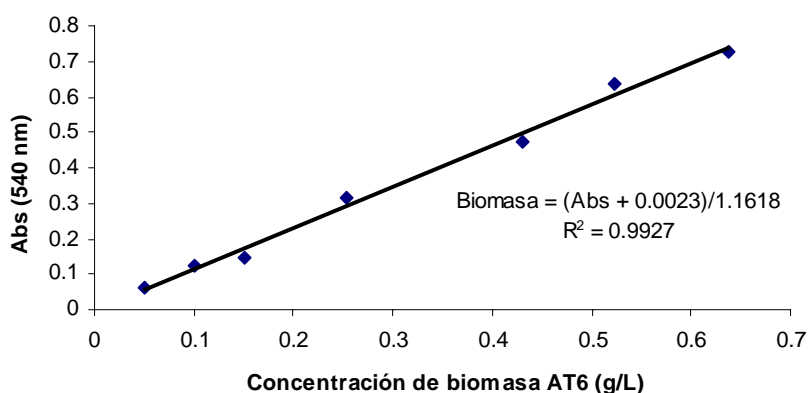


Figura 7.2.3b. Curva patrón para la determinación de biomasa para la cepa AT6.

7.2.4 Determinación de ácidos orgánicos

La concentración de ácidos orgánicos se determinó mediante una técnica de HPLC (equipo Waters, 2695), utilizando una columna de intercambio iónico Aminex HPX-87H, equipadas con un detector UV (210 nm). Una fase móvil de H₂SO₄ 0.008 M se usó con un flujo de 0.6 ml/min y una temperatura de 35 °C. El tiempo de corrida de cada muestra fue de 17 min y las muestras fueron inyectadas por duplicado. La señal del detector fue procesada con un programa PC compatible (Empower, Waters).

7.2.5 Extracción y cuantificación del alginato

Esta técnica se basa en la precipitación del polímero con isopropanol y su posterior cuantificación gravimétrica (Jarman *et al.*, 1978). El procedimiento es como sigue: se mezclaron 10 ml de caldo de cultivo con 1 ml EDTA (0.1 M) y 1 ml de NaCl (1.0 M) y posteriormente se centrifugó a 11,000 rpm (centrífuga Eppendorf 5804) por 25 min. Se separó el sobrenadante y se mezcló con 30 ml de isopropanol, dejando reposar 10 min. para la precipitación del producto (centrifugándose nuevamente a 11,000 rpm por 20 min. para los cultivos en placa). El producto se filtró en membranas *Nucleopore* de 0.22 µm, previamente puestos a peso constante, las cuales se secaron a 70 °C por 24 h en una estufa (Felisa). Finalmente, se pesó y se calculó (por diferencia de peso) la concentración de polisacárido en el medio.

7.2.6 Determinación de sacarosa (DNS, β-fructosidasa)

Este método se basa en la hidrólisis de la sacarosa usando una invertasa (para producir una molécula de glucosa y una de fructosa) y la posterior medición de los azúcares reductores libres por medio de la reducción del ácido dinitrosalicílico (DNS). Se forma un compuesto nitro-aminado amarillo, cuya densidad óptica es proporcional a la concentración de grupos reductores (Miller, 1959).

La solución de DNS se preparó pesando 16 g de NaOH, 300 g de tartrato de sodio y 10 g de DNS y se mezclaron en este orden en 1.0 L de agua destilada, con adición lenta del DNS para evitar precipitación. La solución enzimática se preparó mezclando 20 mg de la enzima β -fructosidasa con 1.0 ml de amortiguador de citratos (0.32 M, pH 4.6). El procedimiento es como sigue: se tomó una alícuota de 1.0 ml del caldo de fermentación y se diluyó 1/25 con agua destilada y se sirvieron 0.9 ml en tubos de ensayo y se mezclaron 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 la solución DNS a cada muestra. Los tubos se calentaron a ebullición durante 5 min, e inmediatamente después se enfriaron en baño de 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. Los valores se extrapolaron en la curva patrón, la cual se elaboró utilizando soluciones de sacarosa en concentraciones de 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/ml (Fig. 6.2.6).

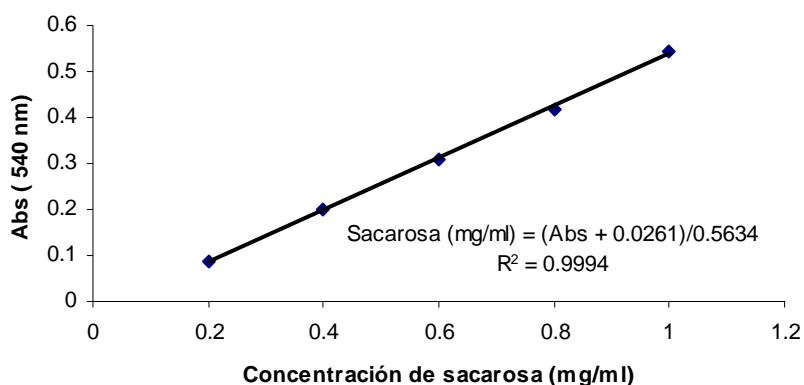


Figura 6.2.6. Curva patrón para la determinación de sacarosa.

7.2.7 Distribución del peso molecular

La distribución de pesos moleculares se determinó por cromatografía de filtración en gel (CFG), usando una serie de columnas Ultrahidrogel (UG 500, 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). Como fase móvil se usó NaNO_3 0.1 M a 35°C a un flujo de 0.9 ml/min. 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 *Aerobasidium pullulans* como estándares de peso molecular con un rango de 5,800 a 788,000 daltones. La muestra de alginato fue filtrada a través de una membrana Millipore de 0.22 μm y una muestra de 50 μl fue subsecuentemente inyectada en el sistema HPLC.

7.2.8 Determinación de PHB por HPLC-UV

La determinación de PHB se llevó a cabo utilizando la técnica de HPLC (equipo Waters, 2695). 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_2SO_4 0.014 N con un flujo de 0.7 ml/min 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).

7.2.9 Análisis reológico

La determinación de los parámetros reológicos de las muestras de fermentación se realizaron en un reómetro marca TA Instruments-Waters LLC modelo Advanced Rheometer 1000 (AR 1000) a 25° C y utilizando una configuración de cono y plato. Cada muestra se determinó por duplicado a diferentes velocidades de deformación (desde 0.5 hasta 1500 s^{-1}) utilizando un cono de acero de 60 mm de diámetro y con un ángulo de inclinación de 1° O' 12". A los datos obtenidos se les ajustó el modelo de la ley de potencia para obtener el índice de consistencia (k) e índice de flujo (n):

$$\tau = K \cdot \gamma^n$$

donde:

τ = esfuerzo de corte (Pa)

K = índice de consistencia (Pa s^n)

γ = velocidad de corte (s^{-1})

n = índice de flujo, para fluidos newtonianos $n = 1$ (adimensional)

Durante las mediciones de las muestras se usaron fluidos Newtonianos de referencia de diferentes viscosidades (Aceites marca Brookfield) para verificar la calibración del equipo.

8 Resultados y discusión

Capítulo I

Cultivos en matraces agitados

8.1 Crecimiento de la mutante AT6 en condiciones no diazotróficas de alta aireación

La mutante AT6 de *Azotobacter vinelandii* no productora de PHB se empleó con el propósito de alcanzar concentraciones de alginato superiores a las obtenidas hasta ahora con la cepa silvestre (ATCC 9046), debido a que presenta una mayor producción de alginato por unidad celular. Sin embargo, la producción volumétrica de alginato se ve limitada debido al pobre crecimiento exhibido durante su cultivo en lote a nivel de matraces agitados (Segura, 2003b). Por esta razón, se diseñaron estrategias que permitieran incrementar el crecimiento de la cepa mutante.

En una primera etapa, se implementaron diferentes estrategias que permitieran favorecer el crecimiento de la cepa mutante AT6 en matraces agitados, independientemente de la producción de alginato. Estos cultivos se realizaron con la finalidad de generar un inóculo con una alta concentración de células, de modo que permitieran alcanzar durante los cultivos en fermentador, una mayor densidad celular en un menor tiempo. Con este propósito se decidió cultivar a la mutante AT6 bajo condiciones de alta aireación. Peña *et al.* (1997) han evaluado el efecto de las condiciones de aireación durante el crecimiento de la cepa parental de *A. vinelandii* (ATCC 9046) a nivel de matraces agitados. En estos estudios se observó que en los matraces de geometría con deflectores, existe una mayor transferencia de oxígeno, lo que favorece el crecimiento de la bacteria. Lo anterior puede ser explicado a través de una mayor actividad en el ciclo de los ácidos tricarbónicos, además en esta condición de cultivo se presenta una menor producción de alginato.

Por tal motivo, se emplearon matraces con deflectores con la finalidad de establecer un sistema de alta oxigenación que permitiera incrementar la producción de

biomasa. Los resultados de estos cultivos se presentan en la figura 8.1. Cada uno de los puntos de las gráficas representa el promedio de tres cultivos independientes. En las figuras se incluyen barras de desviación estándar para mostrar la reproducibilidad de los datos.

En estos cultivos se evaluó la producción de biomasa y se determinó el pH después de 72 h de cultivo, correspondiente al tiempo requerido para que la bacteria se encuentre en fase estacionaria. Como se puede observar, la concentración más alta de biomasa alcanzada en estos cultivos fue de 0.2 g/L.

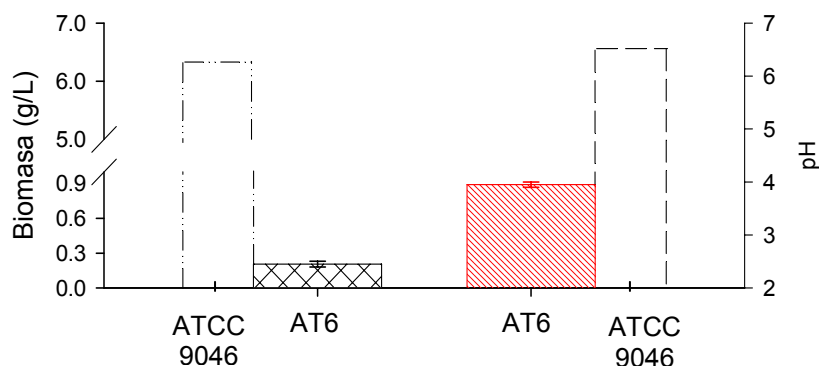




Figura 8.1. Producción de biomasa y pH obtenido en matraces con deflectores con la mutante AT6 de *A. vinelandii*. Biomasa (); pH (). Las líneas punteadas representan los datos obtenidos empleando la cepa ATCC 9046 cultivada en matraces con deflectores por Peña *et al.*, (1997).

Los valores obtenidos, son completamente diferentes a los reportados por Peña *et al.* (1997), empleando la cepa silvestre ATCC 9046 de *A. vinelandii*; reportando un crecimiento cercano a 6 g/L y una caída en el pH de 7.2 a 6.5. Mientras que, en los cultivos con la mutante AT6 se observa una caída drástica del pH de 7.2 a 3.9. Previamente, Mejía (2004) reportó una disminución drástica del pH en el medio de cultivo, lo que afectó el crecimiento de la mutante AT6 cuando se cultivó a nivel de matraces agitados sin deflectores, en un medio conteniendo extracto de levadura como fuente de nitrógeno.

La caída del pH en el medio de cultivo de la cepa AT6, parece estar relacionada con el bloqueo en la síntesis de PHB, causada por la mutación en el operón *phbBAC*, lo cual podría ocasionar un aumento en la disponibilidad intracelular de piruvato, acetil-CoA y en el poder reductor (Segura *et al.*, 2003a; Segura *et al.*, 2003b).

Como previamente se mencionó en los antecedentes, un papel propuesto para el PHB es el de regulador de los equivalentes de reducción intracelulares. Cuando en la célula se presenta una condición de baja concentración de oxígeno y existe una concentración de carbono alta, se favorece la acumulación de NADH y NADPH. Bajo estas condiciones se sintetiza el PHB. Se ha propuesto que la síntesis de este polímero permite regular la concentración de los reductores, ya que almacena electrones durante su síntesis, previniendo la generación de una concentración alta de NAD(P)H y permitiendo el funcionamiento de las vías oxidativas (Senior *et al.*, 1972).

En los datos obtenidos por Peña *et al.* (1997) se observa que aun en condiciones de alta aireación (la cual se establece cuando se emplean matraces con deflectores) la cepa silvestre de *A. vinelandii* ATCC 9046, acumula cerca del 10 % del peso seco en forma de PHB. Por lo que posiblemente la regulación en la biosíntesis del PHB sea más compleja y no dependa únicamente de la concentración de oxígeno. Debido a que la cepa mutante AT6 presenta un bloqueo en la síntesis de PHB, esto causaría un incremento en la acetil-CoA y en el poder reductor. Tal condición podría ocasionar inhibición de las enzimas del ciclo de Krebs (Senior *et al.*, 1972), lo que posiblemente conduciría a la secreción de ácidos orgánicos que no pueden ser completamente oxidados. Estos ácidos orgánicos serían presumiblemente los responsables en la caída del pH.

Datos en la literatura apoyan esta idea. Por ejemplo, Cevallos *et al.* (1996) reportaron que una mutante en el gen *phbC* bloqueó la síntesis de PHB en *R. etli* lo cual promovió la excreción de grandes cantidades de ácidos orgánicos, como piruvato, fumarato, malato, lactato y aminoácidos. Otra diferencia entre la cepa mutante de *R. etli*

y la silvestre se observó en la relación $\text{NAD}^+/\text{NADPH}$, que fue varias veces menor en la cepa mutante, por lo que el efecto de la mutación en la síntesis de PHB provocó el desarrollo de metabolismo “semi-fermentativo”.

Con la finalidad de probar esta hipótesis, se determinaron los ácidos orgánicos responsables de la acidificación del medio de cultivo. Se realizó un análisis de las especies ácidas presentes en el medio de cultivo. Como se puede observar en la tabla 8.1, la cepa mutante AT6 excreta varios ácidos orgánicos como productos de un metabolismo “semi-fermentativo”; mientras que, la cepa silvestre únicamente presentó acumulación de oxalacetato, que es mayor al de la cepa AT6, (28 $\mu\text{mol/ml}$). Lo anterior, posiblemente se deba al cambio en el flujo de carbono, ya que bajo estas condiciones de cultivo la acetil-CoA es continuamente alimentado hacia la síntesis de PHB, debido a una inhibición de la actividad enzimática citrato sintasa (Senior y Dawes, 1971) y por lo tanto se disminuye el flujo de carbono hacia el ciclo de Krebs, resultando en la posible acumulación de oxalacetato.

Tabla 8.1 Concentración de ácidos orgánicos excretados por *A. vinelandii* cultivada en matraces agitados en condiciones de no fijación de nitrógeno.

Condición	Cepa	$\mu\text{mol/ml}$					
		Oxalacetato	Citrato	Malato	Succinato	Lactato	Formato
No diazotrófica	AT6	15.3	8.2	3.7	9.5	4.5	19.5
No diazotrófica	ATCC 9046	28	ND	ND	0.5	0.5	ND

ND, no detectado.

La concentración de ácidos orgánicos por parte de la cepa AT6 es completamente diferente con relación a la cepa silvestre (ATCC 9046), bajo las mismas condiciones de cultivo (condiciones no diazotróficas). Como se observa, algunos de los ácidos orgánicos excretados al medio son intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, lo que apoya la hipótesis de una menor actividad de las enzimas de este ciclo. Ambas cepas excretaron ácido láctico y succínico, pero la cantidad de cada ácido orgánico excretado por la cepa AT6, es superior al excretado por la cepa silvestre. Así,

la cepa mutante excreta 19 veces más ácido succínico que la cepa silvestre y 9 veces más ácido láctico que la cepa silvestre.

El proceso de la producción de lactato, le permitiría a la mutante AT6 regenerar el dinucleótido adenina nicotinamida (NAD^+), ya que la incapacidad de regenerar NAD^+ dejaría a la bacteria sin aceptor electrónico para la oxidación de las moléculas, con lo que se detendrían las reacciones que producen energía. La reducción de piruvato a lactato permitiría a la mutante continuar con la producción de ATP. Estos resultados hicieron evidente que un bloqueo en la síntesis de PHB induce una respuesta “semi-fermentativa” que es caracterizada por un drástico descenso en la actividad del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, posiblemente mediante la inhibición en las enzimas citrato sintasa e isocitrato deshidrogenasa y varias enzimas auxiliares como ha sido descrito para *R. etli* (Encarnación *et al.*, 1995).

8.2 Crecimiento de la mutante AT6 en condiciones diazotróficas y de alta aireación

La fijación de nitrógeno se lleva a cabo por una forma altamente reducida de la nitrogenasa y precisa de ocho electrones. La fuente inmediata de electrones para reducir la dinitrogenasa es variable, pudiéndose utilizar ferredoxina reducida, flavodoxina reducida, en varios casos la fuente inicial de electrones es el piruvato. El nitrógeno atmosférico reducido en forma de NH_4^+ puede asimilarse en principio como componente de los aminoácidos, el NADPH proporciona poder reductor necesario para poder realizar estas reacciones.

Tomando en cuenta lo anterior, se planteó la hipótesis de que la fijación de nitrógeno en la mutante AT6 posiblemente le permita regular los equivalentes de reducción intracelulares, previniendo la generación de una concentración alta de NADPH, de modo que le permita a la célula continuar con el funcionamiento de las vías oxidativas. Por tal razón, se procedió a evaluar el crecimiento de la cepa mutante AT6 cultivada en matraces con deflectores en condiciones diazotróficas. En la figura 8.2 se

presentan los datos obtenidos bajo estas condiciones de cultivo. Del mismo modo, se evaluó la producción de biomasa alcanzada por la mutante AT6 después de 72 h de cultivo y se determinó el pH final.

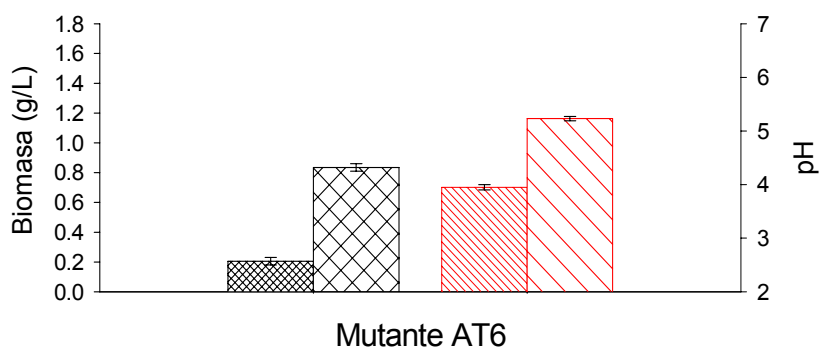


Figura 8.2. Producción de biomasa y pH obtenido en matraces con deflectores con la mutante AT6 en condiciones diazotróficas. Biomasa (\otimes); pH (red diagonal). Producción de biomasa y pH obtenido en matraces con deflectores con la mutante AT6 en condiciones de no fijación de N₂. Biomasa (grid); pH (red diagonal), tomado de la figura 8.1.

Como se puede apreciar (Fig. 8.2), se logró un incremento significativo en la producción de biomasa de 0.8 g/L y se registró una caída máxima en el pH de 7.2 a 5.2 bajo estas condiciones de cultivo. Este comportamiento parece apoyar la idea de que la fijación de nitrógeno en la mutante AT6 le permite regular los equivalentes de reducción intracelulares. La regulación de los portadores electrónicos NADH y NADPH le permitiría a la cepa mutante AT6 continuar operando la vía oxidativa del ciclo de los ácidos tricarbónicos, ya que bajo estas condiciones de cultivo no se presentó una caída drástica en el pH del medio, seguramente debido a una menor excreción de ácidos orgánicos. Esta regulación en el pH del medio, le permitió a la bacteria continuar creciendo bajo estas condiciones de cultivo. Debido a que la disminución drástica en el pH, es el principal factor que limita el crecimiento de la mutante AT6 (Mejía, 2004). A pesar de que se obtuvo un crecimiento importante, Segura et al. (2003a) reportaron un crecimiento máximo de 1.4 g/L (asumiendo que el 50 % del peso seco de la bacteria

corresponde a la concentración de proteína para el caso de la mutante AT6) empleando la misma cepa mutante, bajo condiciones de cultivo de menor transferencia de oxígeno (matraces sin deflectores).

La condición de alta aireación a la cual está sometida la bacteria durante su crecimiento, la obliga a implementar mecanismos para la protección de su sistema nitrogenasa, ya que esta enzima se inactiva irreversiblemente en presencia de oxígeno (Kim y Rees, 1994). En *A. vinelandii* la protección a la nitrogenasa frente al oxígeno, se da principalmente a través de un mecanismo de alta actividad respiratoria (Dalton y Postgate, 1969). Este mecanismo de protección denominado respiración desacoplada es menos efectivo para la producción de ATP. El incremento en la respiración es acompañado por un desacoplamiento del transporte de electrones, lo cual permite incrementar el consumo de oxígeno sin incremento neto en la producción de ATP (Linkerhäger y Oelze, 1996).

Linkerhäger y Oelze (1995), reportaron que cuando *A. vinelandii* es cultivada de manera diazotrófica, en un cultivo continuo y el ambiente es sometido a un repentino incremento en la concentración de oxígeno (estrés oxidativo), los niveles celulares de ATP disminuyen a diferentes velocidades dependiendo del nivel de estrés al cual es sometido. En este caso, la síntesis de ATP se ve reducida debido a que *A. vinelandii* exhibe un aumento en la actividad respiratoria desacoplada, permitiéndole un consumo significativo de oxígeno durante la respiración celular, el cual es esencial para proteger a la enzima de la inactivación por el oxígeno.

Es probable que en cultivos de alta aireación y bajo condiciones diazotróficas bajo las cuales esta sometida la mutante AT6 durante su crecimiento, el aporte de ATP estaría limitado, lo que reduciría los niveles de energía empleados para el crecimiento.

8.3 Crecimiento de la mutante AT6 en condiciones diazotróficas y de baja aireación

Es generalmente reconocido que el control en el suministro de oxígeno es de gran importancia para el crecimiento de *A. vinelandii*, especialmente cuando crece diazotróficamente, ya que la fijación de nitrógeno es más efectiva a menores concentraciones de oxígeno disuelto (Sabra *et al.*, 1999). Durante la fijación de nitrógeno, *A. vinelandii* es capaz de ajustar su tasa de respiración a un amplio rango de oxígeno (Manchal y Vanderleyden, 2000). Por lo que, posteriormente, se decidió modificar las condiciones de aireación durante el cultivo, con la finalidad de reducir el estrés oxidativo para realizar la fijación de nitrógeno, de manera que se produzca más ATP sin dejar de proteger al sistema nitrogenasa, para lo cual se emplearon matraces convencionales durante el cultivo de la mutante AT6. Se evaluó la producción de biomasa alcanzada después de 72 h de cultivo, y se determinó el pH final. En la figura 8.3 se presentan los datos obtenidos bajo estas condiciones experimentales.

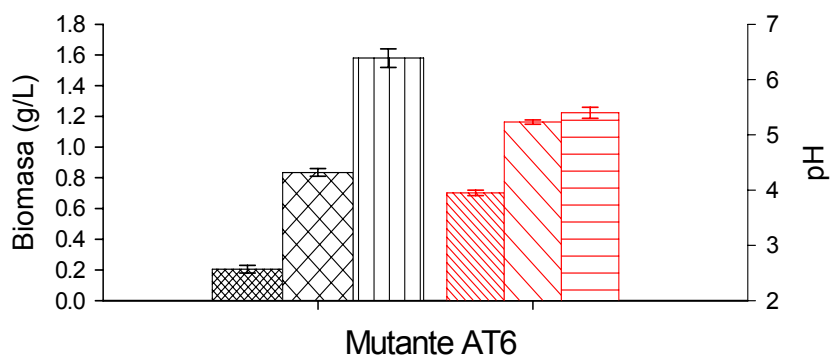


Figura 8.3. Producción de biomasa y pH obtenido en matraces convencionales en condiciones diazotróficas. Biomasa (▨). pH (▤). Producción de biomasa y pH obtenido en matraces con deflectores en condiciones diazotróficas. Biomasa (▩). pH (▥), tomado de la figura 8.2. Producción de biomasa y pH obtenido en matraces con deflectores en condiciones no fijación de N₂. Biomasa (▧). pH (▦), tomado de la figura 8.1.

Como se puede apreciar, se logró un incremento en la producción de biomasa, obteniendo una concentración de 1.6 g/L bajo condiciones diazotróficas de menor aireación. Este valor representa el doble del obtenido en condiciones de fijación de nitrógeno a alta aireación (~0.8 g/L). Este resultado sugiere, que el incremento en la producción de biomasa, podría ser debido al menor gasto de energía en la protección respiratoria de la nitrogenasa, el cual se traduce en un mayor crecimiento celular, ya que bajo estas condiciones de aireación, se presenta probablemente una disminución en la respiración desacoplada. (Linkerhågen y Oelze, 1996).

El crecimiento obtenido bajo las condiciones mencionadas es similar al obtenido por Segura *et al.* (2003a), empleando la misma cepa, pero en condiciones distintas de cultivo. Del mismo modo se determinó el pH, la máxima caída fue de 7.2 a 5.4, debida seguramente a la excreción de ácido algínico y otros ácidos orgánicos (Clementi *et al.*, 1995). Como se puede observar en la tabla 8.2, la concentración de ácidos orgánicos excretados por la cepa AT6 en condiciones de fijación de nitrógeno y baja aireación se redujo considerablemente. Lo cual confirma que el cultivo de la mutante AT6 en una condición diazotrófica, permite regular de manera indirecta el pH del medio de cultivo. Asimismo, una condición de menor aireación permite un mayor crecimiento en condiciones de fijación de nitrógeno.

Tabla 8.2 Concentración de ácidos orgánicos excretados por *A. vinelandii* (mutante AT6) cultivada en matraces agitados en condiciones diazotróficas a baja aireación.

Condición	Cepa	μmol/ml					
		Oxalacetato	Citrato	Malato	Succinato	Lactato	Formato
No diazotrófica	AT6	15.3	8.2	3.7	9.5	4.5	19.5
Diazotrófica	AT6	7.2	ND	0.8	2.5	0.5	2.5

ND, no detectado.

Previamente se había observado, que al controlar el pH mediante la neutralización de los ácidos en el medio de cultivo se promovía el crecimiento de la cepa mutante AT6 (Mejía, 2004). Sin embargo, el control del pH en los matraces resulta complicado y poco práctico. Por lo que al parecer, la condición que limita el

crecimiento estaría ocasionada por la caída del pH y los mecanismos de adaptación a un estrés ácido que emplea la mutante para mantener su viabilidad a pH bajo, más que por la incapacidad de oxidar la fuente de carbono, ya que muchas enzimas esenciales para el metabolismo microbiano se inactivan a pHs ácidos.

La tabla 8.3 muestra un resumen del crecimiento alcanzando bajo las distintas condiciones de cultivo a nivel de matraces y el efecto que se obtiene en el pH del medio de cultivo. Como se observa, la mejor condición para desarrollar un inóculo con la mutante AT6 se logró empleando matraces convencionales (de baja aireación), en condiciones diazotróficas.

Tabla 8.3. Crecimiento y pH final exhibido por la cepa mutante AT6 de *A. vinelandii* bajo diferentes condiciones de cultivos a nivel de matraces agitados.

	Cultivo en matraces		
	<i>Bafleado</i> (<i>Ext. De levadura</i>)	<i>Bafleado</i> (<i>Alta aireación</i>) (<i>Diazotróficamente</i>)	<i>Convencional</i> (<i>Baja aireación</i>) (<i>Diazotróficamente</i>)
Biomasa (g/L)	0.2	0.8	1.6
pH	3.7	5.2	5.4

Capítulo II

Cultivos en biorreactores

8.4 Efecto de la fuente de carbono sobre el crecimiento de la mutante AT6 a nivel fermentador en condiciones diazotróficas

Habiendo definido las condiciones para el desarrollo del inóculo, se llevó a cabo la evaluación de la cepa mutante en cultivos sumergidos a nivel fermentador, bajo las condiciones descritas en la metodología. En una primera etapa se evaluó el efecto de la fuente de carbono sobre el crecimiento de la bacteria. Es importante señalar que *A. vinelandii* utiliza la fuente de carbono mediante la vía Entner-Doudoroff, el ciclo de las pentosas y ciclo de los ácidos tricarboxílicos, para su crecimiento y desarrollo. Esta bacteria puede ser cultivada en una gran variedad de fuentes de carbono, como manitol, sorbitol, glicerol, fructosa, glucosa, sacarosa, manosa y gluconato (Horan *et al.*, 1981).

El estudio de Horan *et al.*, (1981) demostró que, de las diversas fuentes de carbono en las que puede crecer *A. vinelandii*, el glicerol, sacarosa y glucosa promueven un mayor crecimiento celular; no obstante, el glicerol es poco efectivo para la producción de alginato. Lo anterior motivó a evaluar diferentes fuentes de carbono, con la finalidad de poder determinar cual fuente de carbono permitiría sostener un mayor crecimiento.

Por otra parte, es importante señalar que la tensión de oxígeno disuelto (TOD) es un parámetro clave en el crecimiento de *A. vinelandii*, ya que a valores superiores del 5 % de TOD, se favorece el crecimiento bacteriano (Peña *et al.*, 2000). Además, *A. vinelandii* posee una alta velocidad de respiración (Post *et al.*, 1983) y por lo tanto una mayor velocidad de consumo de oxígeno, por lo que en cultivos con bajas TOD el crecimiento se encuentra limitado debido a que presenta una limitación de oxígeno, lo cual tiene como consecuencia efectos importantes en el metabolismo microbiano. Por tal razón, los cultivos en biorreactor se llevaron a cabo usando 10 % de la TOD con la

finalidad de favorecer el crecimiento y prevenir, mediante una mayor actividad del metabolismo oxidativo, el aumento en el poder reductor (NAD(P)H) y la acumulación de acetil-CoA.

Los resultados de estos cultivos en lote se presentan en la figura 8.4. Las fuentes de carbono evaluadas fueron: glucosa, sacarosa y glicerol. Cabe mencionar que los cultivos se realizaron bajo condiciones diazotróficas, ya que es la condición en la que se obtuvo una mayor producción de biomasa a nivel de matraces (ver tabla 8.3).

El pH de estos cultivos se controló de forma rigurosa ya que es un parámetro crítico para el crecimiento de la cepa mutante AT6, también la TOD se mantuvo cercana al *set point* (10 %). En la figura 8.4b y 8.4d se muestra el control típico en el pH y en la TOD respectivamente. En la figura 8.4a se muestran las cinéticas comparativas de crecimiento.

Se observó que la concentración más alta de biomasa alcanzada por la mutante AT6 fue de 3.9 g/L, cuando se emplea sacarosa como fuente de carbón alcanzándose a las 15 h de cultivo (Fig. 8.4a). Lo anterior corresponde al tiempo de cultivo cuando la bacteria entra a la fase estacionaria y la velocidad específica de crecimiento (μ) fue de 0.11 h^{-1} . El crecimiento de esta cepa es menor cuando se cultivó empleando glucosa como fuente de carbono (2.6 g/L), con una μ de 0.075 h^{-1} . Finalmente, cuando la mutante es cultivada en glicerol, se obtiene una menor concentración de biomasa de 2.0 g/L, con una μ de 0.067 h^{-1} .

La diferencia de estos resultados con los previamente reportados por Horan *et al.* (1981), puede explicarse tomando en cuenta que estos autores, evaluaron las diferentes fuentes de carbono (glucosa, sacarosa y glicerol), bajo condiciones de cultivo en las cuales se favorece la producción de alginato (matraces agitados a baja aireación); por lo que la fuente de carbono es destinada tanto para el crecimiento como para la síntesis de alginato. Mientras que, la elevada tensión de oxígeno disuelto a la cual se sometió la

mutante AT6 durante su cultivo, permite dirigir preferentemente la fuente de carbono hacia la producción de biomasa (Peña *et al.*, 2000). Por lo que bajo las condiciones diazotróficas y de una alta TOD evaluadas no se observó producción de alginato.

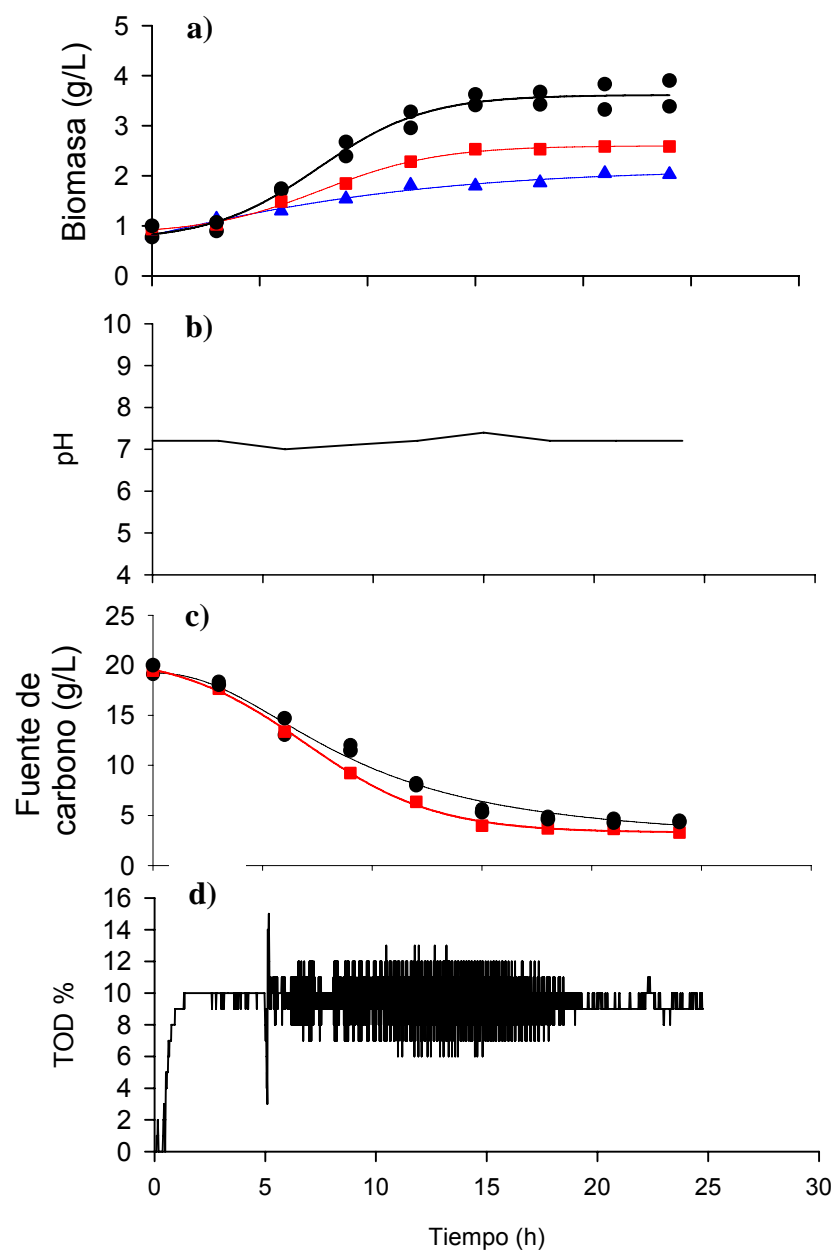


Figura 8.4 Cultivo en lote de la mutante AT6 con diferentes fuentes de carbono. (a) concentración celular; (b) evolución de pH; (c) consumo de la fuente carbono; (d) evolución de la TOD. (●) sacarosa; (■) glucosa; (▲) glicerol.

La menor velocidad de crecimiento obtenida al emplear glicerol como fuente de carbono, puede ser explicada en parte debido a que esta molécula no puede ser incorporada directamente a la vía Entner-Doudoroff. Por lo que el glicerol es oxidado a dihidroxiacetona fosfato, la cual a su vez se isomeriza a gliceraldehido-3-fosfato (ver figura 2.3), incorporando esta última molécula a la vía gluconeogénica para finalmente ser metabolizada, aportando de esta manera, piruvato a la célula.

La figura 8.4c muestra el consumo de la fuente de carbono (sacarosa y glucosa) en las dos condiciones donde se obtuvo un mayor crecimiento al final de la fermentación (24 horas). La sacarosa no se consumió completamente al término de la fermentación, únicamente el 77.5 % de la sacarosa es incorporada por la bacteria, con una velocidad de consumo de $0.89 \text{ (g}_{\text{sac}}/\text{g}_{\text{biom}} \text{ h)}$. Del mismo modo, el consumo de glucosa tuvo un comportamiento relativamente similar al de sacarosa. En este caso, el consumo de glucosa fue del 83 % con una velocidad de consumo de $1.0 \text{ (g}_{\text{sac}}/\text{g}_{\text{biom}} \text{ h)}$, por lo que posiblemente la limitación en el crecimiento se deba a otro nutriente.

A pesar de que se obtuvo un comportamiento similar en el consumo de la sacarosa y en el de glucosa, los rendimientos de biomasa con base en la fuente de carbono ($Y_{x/s}$), fueron muy diferentes. Se obtuvo un valor de $0.17 \text{ g biomasa/g sacarosa}$, para el cultivo con sacarosa y de $0.1 \text{ g biomasa/g glucosa}$ para el caso del cultivo donde se usó glucosa, el cual se refiere a la cantidad de biomasa generada por sustrato consumido. Esto demuestra que la sacarosa es la fuente de carbono que permite soportar un mayor crecimiento.

No obstante al incremento significativo en el crecimiento cuando se cultivó a la mutante AT6 con sacarosa, la fijación de nitrógeno que se presenta bajo estas condiciones de cultivo es altamente demandante de energía, lo cual tiene efectos importantes en el metabolismo microbiano, afectando el crecimiento de bacteria. Además de que esta condición diazotrófica, obliga a la mutante a activar mecanismos

para la protección de su sistema nitrogenasa en cultivos con TOD elevadas ya que la enzima nitrogenasa se inactiva rápidamente por el oxígeno.

Está demostrado que la cadena respiratoria de *A. vinelandii* es ramificada e incluye a la NADH deshidrogenasa desacoplada y el citocromo oxidasa terminal *d*, cuya función es reducir el O₂ a H₂O, y que es crucial para impedir el daño causado por el oxígeno al sistema nitrogenasa (Poole y Hill, 1997). Lo anterior permite desacoplar el metabolismo respiratorio, provocando así, un aumento de la velocidad de consumo de oxígeno y una consiguiente disminución en la producción de energía (Bertsova *et al.*, 1998). Es sabido que hay diferencias importantes en el metabolismo celular si existe una condición de fijación de nitrógeno y este metabolismo cambia considerablemente con respecto a una condición de no fijación de nitrógeno, ya que la célula genera una mayor demanda de energía necesaria para reducir el nitrógeno atmosférico a NH₄⁺ durante el crecimiento celular, lo cual impactaría directamente en la producción de biomasa.

8.5 Cultivo en lote de la mutante AT6 a nivel fermentador con fuente de nitrógeno.

Con la finalidad de favorecer el crecimiento y evitar una respiración desacoplada, se procedió a adicionar una fuente nitrogenada para reducir el gasto energético impuesto por la fijación de nitrógeno. A diferencia de lo que ocurre durante el cultivo de la mutante AT6 a nivel de matraces agitados, donde no se controla el pH y la fijación de nitrógeno permitía regular de manera indirecta la disminución en el pH, los cultivos realizados en el fermentador permiten un control continuo del pH y como se ha mostrado, este control es realizado con bastante precisión (Fig. 8.4b).

Brivonese y Sutherland (1989), compararon cultivos de *A. vinelandii* realizados con diferentes fuentes nitrogenadas (orgánicas e inorgánicas) y observaron que en presencia de amonio (el producto final de la fijación de nitrógeno) la síntesis de alginato por *A. vinelandii* se afecta negativamente. Por su parte Tinoco (1993), estudió el efecto de diferentes fuentes de nitrógeno al medio de cultivo, analizando fuentes

inorgánicas como acetato de amonio, cloruro de amonio y sulfato de amonio. También utilizó fuentes orgánicas como peptona triptona y extracto de levadura, observando que cuando *A. vinelandii* se cultiva en presencia de una fuente de nitrógeno, como el extracto de levadura, su crecimiento se incrementa. Por esta razón se decidió utilizar extracto de levadura como fuente de nitrógeno a una concentración de 3 g/L. En la figura 8.5 se muestra el efecto que produjo la adición del extracto de levadura como fuente de nitrógeno y su comparación con el cultivo en condiciones diazotróficas. En esta figura se presentan las cinéticas de crecimiento, producción de alginato, consumo de sacarosa, pH y el perfil de control de la TOD durante 24 h de cultivo.

Como se puede observar, la adición de una fuente de nitrógeno en el cultivo de la cepa AT6 promovió un mayor crecimiento celular, alcanzando una producción máxima de biomasa de 7.5 g/L y una velocidad específica de crecimiento de 0.13 h⁻¹; mientras que, en condiciones de fijación de nitrógeno, únicamente se alcanzó una concentración de 3.9 g/L con una μ de 0.11 h⁻¹ (Fig. 8.5a).

Es interesante señalar que la adición de extracto de levadura al medio de cultivo, no solo permitió incrementar la producción de biomasa, también favoreció la producción de alginato en el cultivo de la cepa AT6 (Fig. 8.5b), alcanzando una concentración de 2.2 g/L, a pesar de no ser las condiciones óptimas para la síntesis de alginato (Peña *et al.*, 2000). Se sabe que la actividad de dos enzimas clave en la síntesis de alginato (fosfomanosa isomerasa y GDP manosa pirofosforilasa) se incrementan en concentraciones de oxígeno de 1 a 5 % y disminuyen a niveles mayores de oxígeno (Horan *et al.*, 1983).

Brivonese y Sutherland (1989) observaron que podían alterar el rendimiento en la producción del alginato ($Y_{p/x}$) sintetizado por *A. vinelandii* cuando el medio de cultivo es suplementado con una fuente de nitrógeno (peptona), sugiriendo un rol más específico para los nutrientes nitrogenados. Sin embargo, la naturaleza exacta de cómo influyen estos componentes nitrogenados permanece sin ser elucidada.

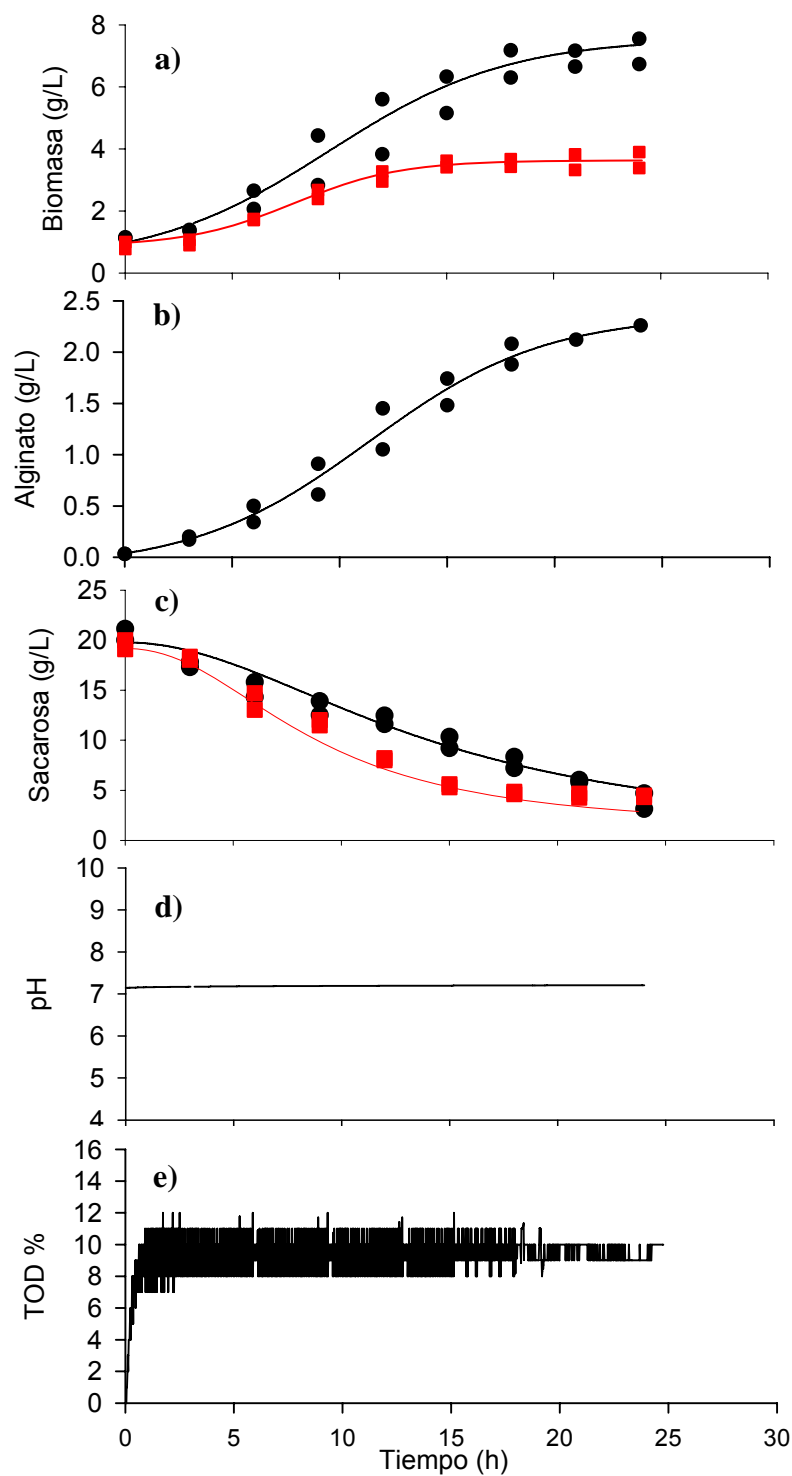


Figura 8.5 Cultivo en lote de la mutante AT6 en condiciones de no fijación de N₂. (a) concentración celular; (b) producción de alginato; (c) consumo de sacarosa; (d) evolución de pH; (e) evolución de la TOD. (●) no fijación de N₂; (■) fijación de N₂.

En la figura 8.5c se presenta el consumo de sacarosa en las dos condiciones evaluadas. En ambos casos la sacarosa no se consumió completamente al término de la fermentación (24 h), con una velocidad de consumo de 0.7 ($\text{g}_{\text{sac}}/\text{g}_{\text{biom}} \text{ h}$). El rendimiento entre la biomasa generada y el sustrato consumido ($Y_{x/s}$), fue superior para la condición de no fijación de nitrógeno obteniendo un valor de 0.4 g biomasa/g sacarosa, a diferencia de los 0.17 biomasa/g sacarosa obtenidos para el cultivo en condiciones diazotróficas. La adición de una fuente nitrogenada al medio de cultivo, mejoró sensiblemente el rendimiento de la biomasa generada a partir de la fuente de carbono, canalizando preferentemente la fuente de carbono y energía hacia un mayor crecimiento celular.

El rendimiento ($Y_{x/s}$) de 0.4 g biomasa/g sacarosa aquí reportado, es superior a los valores reportados por Trujillo-Roldán (2001a), para cultivos de *A. vinelandii* con la cepa ATCC 9046 (en condiciones de no fijación de nitrógeno). De acuerdo con estos autores, a bajos niveles de TOD (1 %) se obtiene un valor máximo de $Y_{x/s}$ de 0.3 g biomasa/g sacarosa. Sin embargo, el alto valor reportado por este autor puede ser debido a la acumulación del polímero de reserva PHB, ya que el crecimiento se determinó por un método gravimétrico, el cual no permite diferenciar entre los cambios ocasionados por multiplicación celular y la acumulación de productos intracelulares como el PHB.

El elevado valor en la TOD (10 %), aunado con una condición de no fijación de nitrógeno permitió el uso mas eficiente de la fuente de carbono para la producción de biomasa, demostrando que a valores elevados de oxígeno disuelto la producción de biomasa se ve maximizada; además, esta condición de no fijación, permite también la síntesis de alginato. La alta tensión de oxígeno disuelto bajo la cual se cultiva a la mutante AT6, posiblemente permite una mayor actividad de las enzimas involucradas en el ciclo de los ácidos tricarbónicos, lo que permitiría una mayor síntesis de ATP, necesario para la síntesis del polímero alginato que es demandante de energía (Jarman y Pace 1984).

La tabla 8.4 muestra el efecto que tuvo la adición de una fuente de nitrógeno sobre el crecimiento de la mutante AT6 a nivel de fermentador. Bajo estas condiciones de cultivo se logró mantener un control preciso en el pH, de modo que permitiera mejorar la producción de biomasa.

Tabla 8.4. Crecimiento exhibido por la cepa mutante AT6 de *A. vinelandii* bajo diferentes condiciones de cultivos a nivel fermentador.

	Cultivo en fermentador	
	<i>Cultivo en condiciones diazotróficas</i>	<i>Cultivo con fuente de nitrógeno</i>
Biomasa (g/L)	4.0	7.5
Alginato (g/L)	0	2.2

8.6 Cultivo alimentado de la mutante AT6 a nivel fermentador

En una segunda etapa, cuando se alcanzó un crecimiento celular significativo, se procedió a realizar la alimentación mediante un pulso de sustrato y nutrientes. Al mismo tiempo se modificaron las condiciones de cultivo, disminuyendo la velocidad de agitación y cambiando la TOD. Esto con el propósito de favorecer la producción de alginato.

En estudios recientes realizados en cultivos exponencialmente alimentados (Priego-Jiménez et al. 2005), se observó que al disminuir la μ de *A. vinelandii* mediante una limitación por fuente de carbono, se podía incrementar el rendimiento en la producción de alginato, estableciendo una relación inversa entre μ y el $Y_{p/x}$, así como en el peso molecular del alginato sintetizado. Sin embargo, durante los cultivos en lote realizados con la cepa mutante AT6, no se presentó limitación en el crecimiento por agotamiento de fuente de carbono, por lo que se decidió limitar el crecimiento de la bacteria durante la etapa de alimentación a través de la manipulación en la TOD, con la finalidad de maximizar la producción de alginato. Los cultivos alimentados de la

mutante AT6, se realizaron por triplicado, la fase de cultivo en lote llegó hasta las 18 horas de cultivo, correspondiente al tiempo cuando se observa una desaceleración en la velocidad de crecimiento, dando inicio a la etapa de alimentación. En la figura 8.6 se presentan los resultados del cultivo alimentado. Las líneas punteadas verticales indican el tiempo de alimentación.

Como se observa en la figura 8.6a, en la etapa de alimentación se disminuyó la velocidad específica de crecimiento, mediante la manipulación en la TOD de 10 a 1 % (Fig. 8.6d), esto con la finalidad de someter a la bacteria a una condición que limite su crecimiento. Al limitar el crecimiento de la bacteria mediante la manipulación del oxígeno disuelto, se pretende favorecer el rendimiento de la producción de alginato ($Y_{p/x}$), así como su peso molecular. Tal como lo demuestran los estudios previos por Priego-Jiménez *et al.* (2005), quienes observaron que en *A. vinelandii* la producción de alginato por unidad celular y su peso molecular se favorece conforme la μ disminuye y este efecto fue particularmente pronunciado a velocidades específicas de crecimiento por debajo de 0.09 h^{-1} .

La limitación de oxígeno durante la etapa de alimentación disminuyó considerablemente el crecimiento y tuvo un gran efecto en el metabolismo celular y por lo tanto en la vía de biosíntesis del alginato. Confirmando que el flujo de carbono es influenciado directamente por la tensión de oxígeno del medio.

En la figura 8.6b se muestra la cinética del consumo de sacarosa durante la etapa en lote, y en la zona de alimentación. Obteniendo una velocidad de consumo de 0.7 ($g_{\text{sac}}/g_{\text{biom}} \text{ h}$) durante la etapa en lote a una TOD del 10 %. Al cambiar la tensión de oxígeno entre 0 y 1 % durante la etapa de alimentación, las células presentan una menor velocidad de consumo de 0.2 ($g_{\text{sac}}/g_{\text{biom}} \text{ h}$), lo cual puede ser explicado considerando que a TOD menores, las células presentan un ciclo de ácidos tricarbónicos menos activo y por lo tanto una menor actividad metabólica. Como se observa en la figura, la

sacarosa no se consume completamente al final del cultivo obteniendo concentraciones de 6.5 g/L.

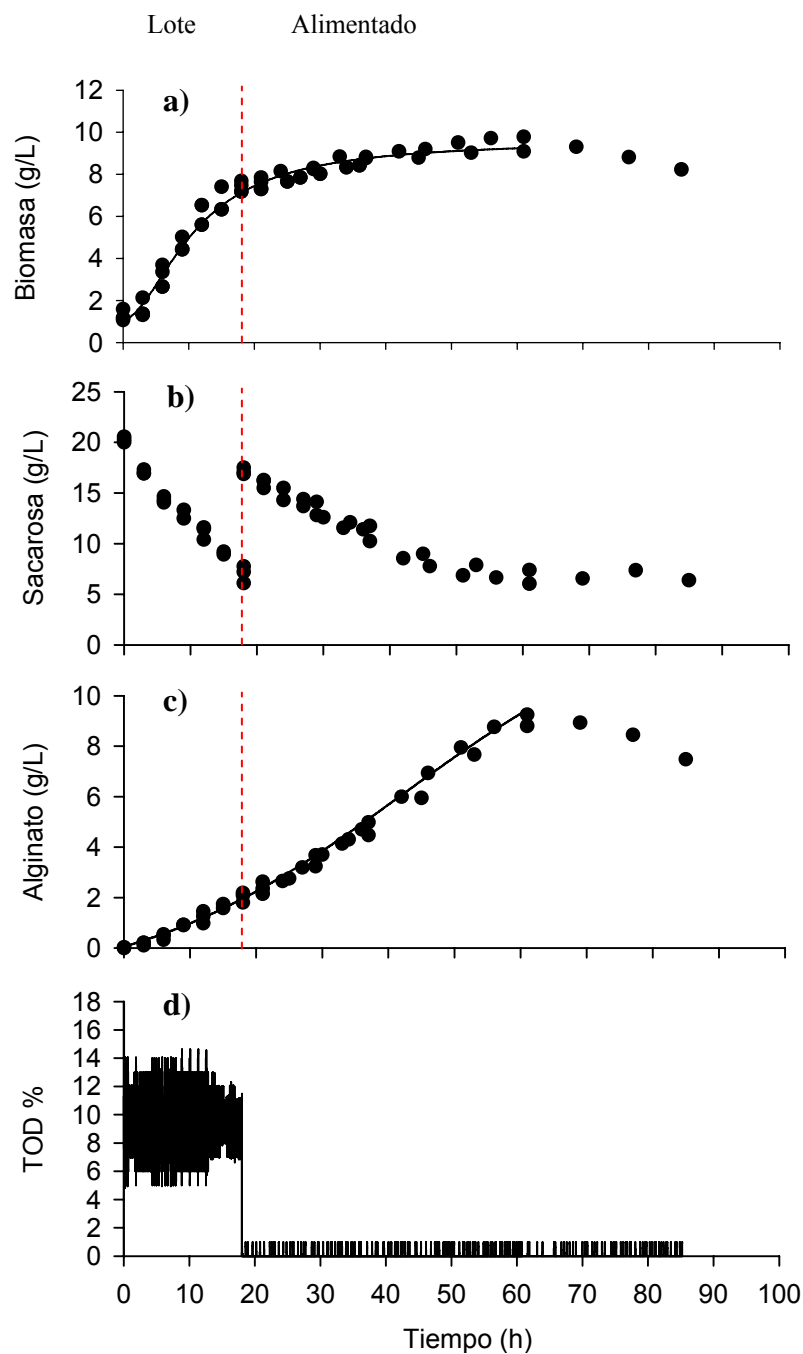


Figura 8.6 Cultivo alimentado de la mutante AT6. (a) Concentración celular; (b) consumo de sacarosa; (c) producción de alginato; (d) evolución de la TOD.

Es interesante observar que, a pesar de someter a la cepa mutante AT6 a una TOD entre 0 y 1 % (Fig. 8.5d), donde se espera un estado “pseudoestacionario” de crecimiento, la bacteria continua destinando la fuente de carbono para la producción de biomasa. Incrementando la concentración de biomasa en ~ 2 g/L, para alcanzar una concentración final de 9.5 g/L. La velocidad específica de crecimiento en esta etapa fue de 0.006 h^{-1} .

En la figura 8.6c se presenta la cinética de producción de alginato. La máxima producción de alginato alcanzada, fue de 9.2 g/L. Este valor fue mayor en comparación a lo reportado previamente con cultivos de *A. vinelandii* con la cepa silvestre y otras cepas mutantes (Parente *et al.*, 1998; Sabra *et al.*, 1999; Peña *et al.*, 2000, Galindo *et al.*, 2007), quienes reportan concentraciones máximas de alginato de 5.2 g/L en cultivos en lote a nivel fermentador. Bajo estas condiciones ambientales y empleando la cepa mutante AT6 en un sistema tipo lote alimentado, el alginato generado fue casi dos veces mayor que el alginato sintetizado en el cultivo en lote. En la etapa de alimentación, el $Y_{p/x}$ fue de ~ 1 g de alginato/g biomasa. Cabe señalar que la producción volumétrica del polímero obtenido con esta estrategia de cultivo es la máxima reportada en la literatura.

La mutación en la cepa AT6 aunado con una estrategia de fermentación en un cultivo lote alimentado, además de la manipulación de la TOD y del pH son en gran medida los principales factores que promueven la mayor síntesis de alginato por *A. vinelandii*. Demostrando que la cepa mutante AT6 de *A. vinelandii* sintetiza más alginato como respuesta de adaptación a condiciones ambientales que limitan su crecimiento.

Horan *et al.* (1981), observaron un incremento en la concentración de alginato durante el cese del crecimiento de *A. vinelandii* y el cual es atribuido a una posible competencia por intermediarios esenciales involucrados, tanto en la biosíntesis de la pared celular, así como en la biosíntesis de exopolisacáridos. Por su parte, Sutherland

(1977) sugiere que, el incremento en la síntesis de alginato podría estar relacionado con la disponibilidad de intermediarios comunes incluyendo GDPmanosa y lípidos isoprenoides durante la fase estacionaria, los cuales son también utilizados en la síntesis de peptidoglicanos y lipopolisacaridos durante el crecimiento celular.

8.7 Cultivo alimentado de la cepa silvestre ATCC 9046 a nivel fermentador

Con el propósito de comparar el desempeño de la cepa AT6 con la cepa silvestre, se procedió a evaluar a la cepa silvestre bajo las mismas condiciones de cultivo. Los resultados de estos cultivos se muestran a continuación.

En la figura 8.7 se muestra un comparativo de las cinéticas de crecimiento (Fig.8.7a), consumo de sacarosa (Fig. 8.7b), producción de alginato (Fig. 8.7c) y el control en la TOD (Fig8.7d) de la cepa silvestre y de la cepa mutante AT6. Como se puede observar durante la etapa en lote, la cepa silvestre creció a una velocidad específica de crecimiento (0.2 h^{-1}), mayor a la de la cepa mutante AT6 (0.13 h^{-1}). Alcanzado una concentración máxima de 8.1 g/L en la etapa en lote, por lo que fue necesario realizar la alimentación a las 12 h de cultivo, 6 horas antes con respecto a la alimentación realizada con la mutante AT6.

A diferencia de lo observado con la cepa AT6, durante la fase de alimentación, la cepa silvestre permaneció en un estado de crecimiento “pseudoestacionario” y por lo tanto no se observó un aumento neto de concentración de biomasa, por lo que el crecimiento se controló de forma más rigurosa mediante la manipulación en la TOD.

En cuanto a la producción de alginato, en la figura 8.6b, se presenta la cinética de producción de alginato. Se alcanzó una máxima producción durante la etapa de alimentación de 4.8 g/L , considerablemente menor a lo obtenido con la cepa mutante AT6 (9.2 g/L).

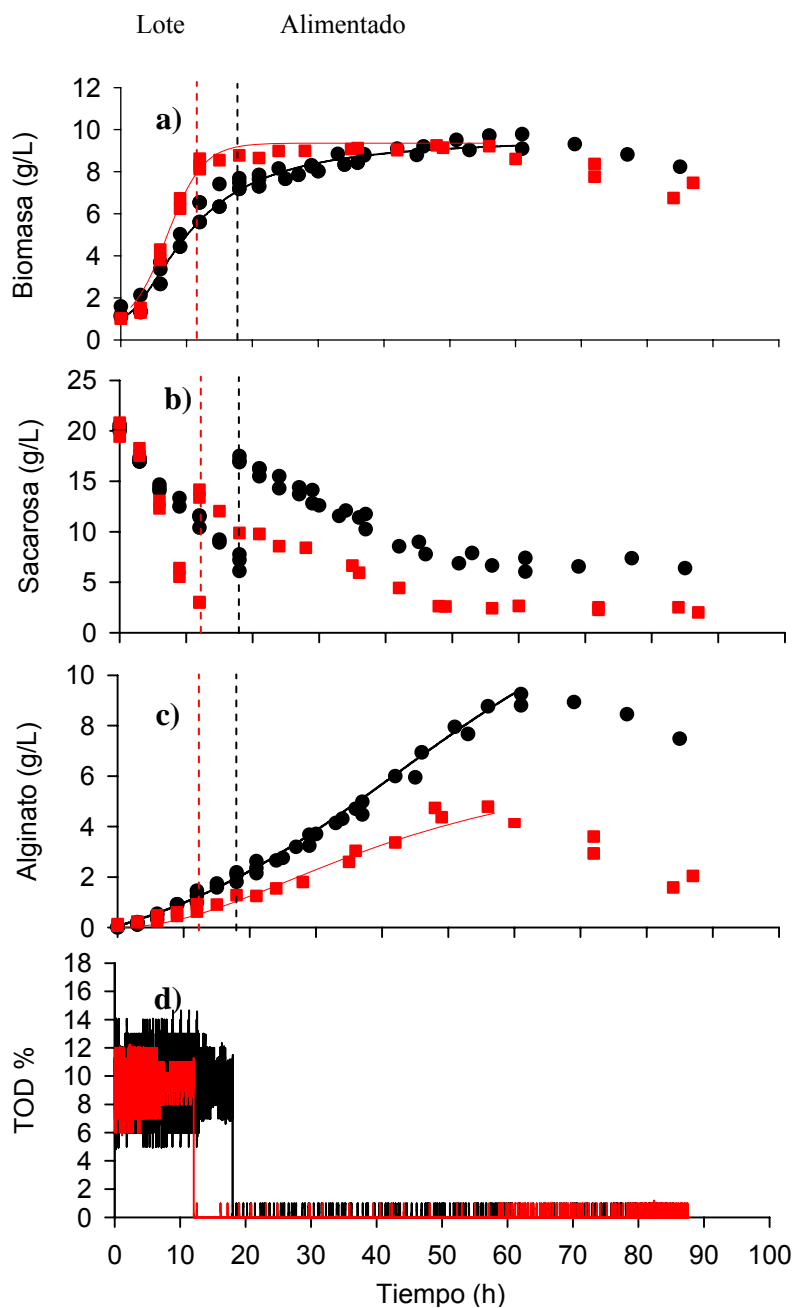


Figura 8.7 Cultivo alimentado comparativo de cepa silvestre. (a) Concentración celular; (b) consumo de sacarosa; (c) producción de alginato; (d) control de la TOD. Cepa silvestre (■). Cepa mutante AT6 (●).

Como previamente se mencionó, en *A. vinelandii* la biosíntesis de PHB se realiza mediante tres actividades enzimáticas. El primer paso de la vía consiste en la

condensación de dos moléculas de acetil-CoA catalizada por la enzima β -cetotiolasa para generar acetoacetil-CoA, la cual es reducida utilizando NADPH y produciendo β -hidroxibutiril-CoA, que es el sustrato que finalmente es polimerizado para generar PHB (Fig. 2.3). Un punto de control importante en esta vía se da a través de la actividad en la enzima β -cetotiolasa la cual es controlada de manera alostérica y es activada cuando la relación acetil-Coa/CoA es alta (Senior *et al.*, 1972).

Bajo condiciones de no limitación de oxígeno, la molécula acetil-CoA es alimentada al ciclo de los ácidos tricarbónicos. Sin embargo, bajo condiciones de limitación de oxígeno y exceso de fuente de carbono se acumula NAD(P)H como respuesta a la baja concentración de oxígeno en el medio. Este metabolito inhibe a las enzimas del ciclo de los ácidos tricarbónicos, lo que disminuye el flujo de carbono hacia este ciclo, por lo que genera un incremento de la relación acetil-CoA/CoA y por lo tanto la estimulación de la actividad de β -cetotiolasa. Bajo estas condiciones de cultivo, la cepa silvestre (ATCC 90346) destina el flujo de carbono principalmente hacia la síntesis de PHB mediante la incorporación continua del acetil-CoA. Lo anterior provoca una limitación en el flujo del ciclo de los ácidos tricarbónicos, lo cual sería presumiblemente lo que permite un control más riguroso en el crecimiento y una aproximación al estado “pseudostacionario” durante la etapa de alimentación. Mientras que en la cepa mutante, al tener bloqueada la síntesis de PHB, la acetil-CoA estaría siendo canalizada hacia el ciclo de los ácidos carboxílicos y por lo tanto promover un mayor crecimiento.

La menor producción de alginato por parte de la cepa silvestre (ATCC 9046), posiblemente es debido en gran parte a la acumulación de altas concentraciones de PHB, esta acumulación demuestra que la fuente de carbono que se emplea para la síntesis de PHB puede ser canalizada por parte de la cepa AT6 hacia la producción de alginato, evitando así, un derroche en la fuente de carbono cuando se busca maximizar la producción de alginato.

Debido a que el alginato y el PHB son dos polímeros que compiten por la fuente de carbono, es posible que durante la etapa de alimentación, el control en la TOD modifique el flujo de carbono en la cepa silvestre, lo cual limitaría la producción de alginato debido a la acumulación de PHB (Galindo *et al.*, 2007).

Con la finalidad de determinar el efecto de la variación en la TOD sobre la acumulación de PHB, se cuantificó la acumulación del PHB bajo estas condiciones de cultivo. Como muestra la figura 8.7.1 se observó que durante la etapa del cultivo en lote, en el que se mantiene un valor elevado en la TOD (10 %), la cepa silvestre comienza a acumular PHB alcanzando una concentración de 1 g/L. Mientras que al variar la TOD en un rango 0 y 1 % (Fig. 8.7d), se presenta un mayor incremento en la producción de PHB, llegando hasta valores de 5 g/L, lo cual parece estar relacionado con la menor producción de alginato por parte de la cepa silvestre, demostrando el efecto causado por la tensión de oxígeno disuelto sobre la acumulación del PHB.

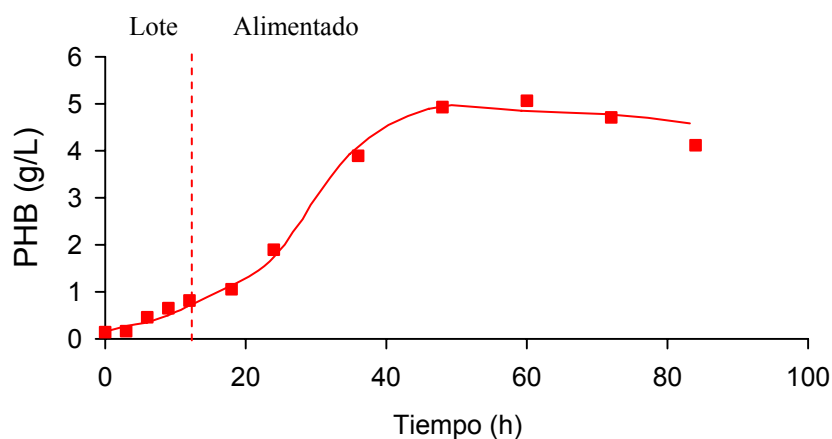


Figura 8.7.1 Cinética de acumulación de poli- β -hidroxibutirato (PHB), en cultivo lote alimentado de *A. vinelandii* ATCC 9046.

Como se puede observar, la concentración de PHB que es sintetizado por la cepa silvestre, es similar a la concentración de alginato extra que se logra empleando la cepa

mutante AT6, lo cual demuestra que el flujo de carbono puede ser canalizado hacia la producción de alginato.

Con el propósito de realizar un análisis comparativo, se evaluó la influencia de la TOD sobre la distribución de la sacarosa en base al rendimiento obtenido en la producción de alginato, PHB, biomasa y el rendimiento global (equivalente a la suma de los rendimientos previos), durante el cultivo en lote y lote alimentado (Tabla 8.5).

Tabla 8.5 Rendimiento de la fuente de carbono durante el crecimiento de *A. vinelandii* y rendimiento en la producción de alginato por unidad celular.

Cepa	Cultivo	$Y_{x/s}$	$Y_{p_{alg}/s}$	$Y_{p_{PHB}/s}$	Y_{global}	$Y_{p_{alg}/x}$
ATCC 9046	Lote	0.35 ± 0.04	0.04 ± 0.006	0.03	0.42	0.11 ± 0.01
	Alimentado	0.1 ± 0.02	0.34 ± 0.04	0.44	0.89	0.56 ± 0.1
AT6	Lote	0.5 ± 0.04	0.15 ± 0.03	-	0.65	0.34 ± 0.15
	Alimentado	0.2 ± 0.04	0.74 ± 0.2	-	0.94	0.95 ± 0.2

Como se muestra en la tabla 8.5, durante el cultivo en lote de la cepa silvestre ATCC 9046 y la cepa mutante AT6, se presenta un mayor rendimiento en la producción de biomasa en base a la sacarosa ($Y_{x/s}$). Este efecto es originado por el aumento en la TOD (10 %), favoreciendo el crecimiento de la bacteria sobre la producción de alginato ($Y_{p_{alg}/s}$) o en el caso de la cepa ATCC 9046 sobre la acumulación de PHB ($Y_{p_{PHB}/s}$). Asimismo, durante la etapa de alimentación, se observó un aumento en el rendimiento de alginato en base a la sacarosa por parte de la mutante AT6 (0.74 g alginato/g sacarosa) y la consecuente disminución del rendimiento en la biomasa, ocasionado por el cambio en el flujo de carbono al disminuir la TOD (ver Fig. 8.7), canalizando de esta forma la fuente de carbono preferentemente hacia la producción de alginato. Sin embargo, en los cultivos de la cepa ATCC 9046 el cambio en la TOD durante la etapa de alimentación, incrementó el rendimiento en la producción de alginato (0.34 g alginato/g sacarosa) y PHB (0.44 g PHB/g sacarosa), debido a que estos dos polímeros

compiten por la fuente de carbono bajo estas condiciones de cultivo. Estos resultados indican que la distribución del carbono puede ser controlado a través de la TOD.

Además, como se observa, el rendimiento global es decir, la sumatoria de los rendimientos $Y_{X/S}$, $Y_{p_{alg}/S}$ y $Y_{p_{PHB}/S}$ en ambas cepas es muy similar durante la etapa de alimentación, obteniendo un Y_{global} de ~ 0.9 g/g. Sin embargo, el Y_{global} entre las distintas etapas de cultivo (lote y alimentado), presenta claras diferencias, posiblemente debidas a las distintas velocidades de respiración; ya que durante la etapa del cultivo en lote en el que se mantiene un valor elevado en la TOD (10 %), *A. vinelandii* presentaría una mayor velocidad de respiración y por lo tanto una mayor generación de CO_2 que no es cuantificado. Mientras que en la etapa de alimentación, la velocidad de respiración disminuiría debido a la limitación en la TOD. Con respecto a la producción de alginato por unidad celular, se observa un considerable incremento al disminuir la μ durante la etapa de alimentación, alcanzando un $Y_{p/x}$ de 0.95 ± 0.2 g alginato/g biomasa, para el caso de la cepa mutante AT6.

Capítulo III

Características fisicoquímicas del alginato

8.8 Peso molecular del alginato obtenido durante los cultivos en fermentador

En una tercera etapa se procedió a analizar las características químicas del alginato obtenido durante los cultivos alimentados. Con el propósito de determinar sus posibles aplicaciones. En la figura 8.8 se muestra la evolución del peso molecular promedio (PMP) del alginato sintetizado por la cepa mutante AT6 y por la cepa silvestre (ATCC 9046) de *A. vinelandii*.

Es interesante destacar que durante el cultivo en lote, en el que se mantiene un valor constante en la TOD (10 %), la cepa mutante AT6 y la cepa silvestre sintetiza alginatos con un peso molecular promedio relativamente constante de 80 kDa y 120 kDa respectivamente. Este valor es similar a los obtenidos por Peña *et al.* (2000), quienes realizaron fermentaciones con la misma cepa silvestre bajo condiciones similares (700 rpm), y a una TOD de 5 %, obteniendo pesos moleculares del orden de los 100 kDa.

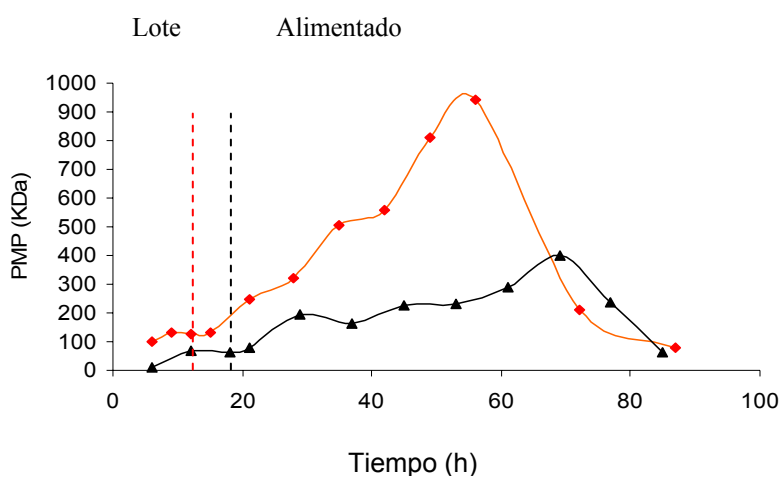


Figura 8.8. Evolución del peso molecular promedio del alginato obtenido durante el cultivo alimentado de *A. vinelandii*. Mutante AT6 (▲); cepa silvestre (◆).

Trujillo-Roldán *et al.* (2004) demostraron que el peso molecular del alginato está fuertemente influenciado por la TOD. En cultivos con control de la TOD a 3 % y a 700 rpm, observaron que el peso molecular fue similar durante todo el desarrollo del cultivo. Los resultados indican que el complejo polimerasa genera distribuciones bien definidas de polímeros y que, a su vez, este proceso está estrechamente relacionado con la TOD. Sin embargo, el proceso intermedio en la biosíntesis del alginato, en el cual los intermediarios (monómeros u oligómeros) tienen que cruzar la membrana interna y ser polimerizados a ácido polimanurónico, sigue siendo desconocido.

Durante la etapa de alimentación, al cambiar la TOD a valores en un rango de 0-1 % y al disminuir la velocidad de agitación de 700 a 300 rpm, se muestra un incremento significativo en el peso molecular del alginato sintetizado por ambas cepas con relación al alginato sintetizado durante la etapa en lote. El PMP máximo del alginato producido durante la etapa de alimentación fue de 399 kDa para el caso de la cepa mutante AT6; mientras que, el PMP en los alginatos de los cultivos llevados a cabo con la cepa silvestre, siempre fue mayor (944 kDa) que en los cultivos llevados a cabo con la cepa mutante (Fig. 8.8).

Peña *et al.* (2000) reportaron como la TOD (en un intervalo de 0.5 a 5 %) y la hidrodinámica (velocidad de agitación en el intervalo de 300 a 700 rpm), afectaba el peso molecular del alginato. Obteniendo los valores más altos del peso molecular del alginato a bajas velocidades de agitación. Además, el PMP del alginato obtenido fue función del oxígeno disuelto en el medio de cultivo. Por su parte, Reyes *et al.* (2003) observaron que en cultivos sumergidos en fermentador, el peso molecular del alginato se favoreció al operar el fermentador bajo condiciones prolongadas de microaerofilia.

En la figura 8.9 se presentan las distribuciones de los pesos moleculares del alginato sintetizado a diferentes tiempos de cultivo. Cabe señalar que entre más desplazado esté el cromatograma hacia la izquierda de la figura, mayor es el peso molecular del alginato.

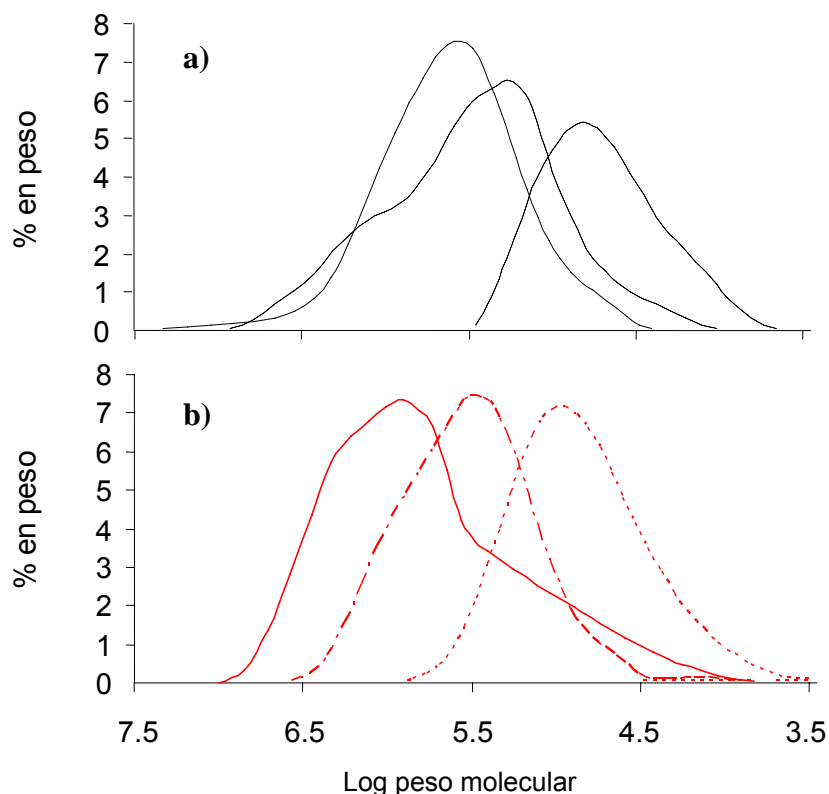


Figura 8.9 Distribución del peso molecular del alginato producido durante el cultivo alimentado de *A. vinelandii*. a) Mutante AT6: (····) 12 h; (·-·-·) 29 h; (—) 69 h. b) Cepa Silvestre: (····) 6 h; (·-·-·) 28 h; (—) 56 h.

Como se observa (Fig. 8.9a), para el caso del alginato aislado de los cultivos con la cepa AT6; durante la etapa de alimentación (29 a 69 h) se presenta dos nuevas distribuciones de alginato de más alto peso molecular que se sintetizan, a diferencia de la distribución que se obtiene durante la etapa en lote (12 h). Como previamente se había discutido *A. vinelandii* sintetiza una única distribución de alginatos durante todo el cultivo bajo condiciones controladas de oxígeno disuelto. Una posible explicación a este hecho es que el alginato que se analizó en la etapa de alimentación es el resultado de la mezcla del alginato que se sintetiza en la etapa en lote y aquel que se produce en la etapa de alimentación. Por lo que este efecto podría ser un proceso de “dilución” con los alginatos de menor peso molecular producidos durante la etapa en lote.

En la misma figura (8.9b), se presentan las distribuciones de peso molecular del alginato que se produce en los cultivos con la cepa silvestre (ATCC 9046). Al igual que con la cepa AT6, hay un cambio en la distribución del peso molecular al pasar de la etapa de cultivo en lote a la etapa alimentada. Sin embargo a diferencia de lo anterior, el peso molecular continúa aumentando aun en la etapa de alimentación (28 y 56 h). En este caso, el proceso de “dilución” con los alginatos de menor peso molecular sintetizados durante la etapa en lote no permite explicar completamente la diferencia en la distribución del PMP.

Durante la etapa de alimentación la tensión de oxígeno varió entre 0–1 %, por lo que este pudiera ser el factor responsable que promueva la síntesis de un alginato de mayor peso molecular en comparación con lo ocurrido durante la etapa en lote del cultivo. La polimerización es un proceso aun no elucidado, por lo que es difícil ofrecer una explicación del peso molecular del alginato obtenido. Sobre este punto, cabe mencionar que en el trabajo de Trujillo-Roldán *et al.* (2001b), quienes reportaron el efecto de oscilaciones en la TOD sobre el alginato producido por *A. vinelandii*. En este trabajo se pudo observar que las oscilaciones tenían un efecto importante sobre el PMP del alginato. Los resultados de este estudio hicieron evidente la compleja regulación que tiene *A. vinelandii* sobre cambios muy pequeños en la TOD, principalmente en las características moleculares del polímero. Demostrando que el sistema enzimático involucrado en la polimerización es muy sensible a cambios en la TOD.

En general, los resultados indican que los cultivos bajo condiciones de limitación de oxígeno permitieron reducir la velocidad de crecimiento, lo cual tiene un claro efecto sobre la producción de alginato y el del peso molecular, dando la posibilidad de sintetizar alginatos de mayor peso molecular a través de la manipulación en la TOD. En este sentido, es interesante destacar que durante el crecimiento de *A. vinelandii* en cultivos por lote alimentado limitados por la fuente de carbono, Priego-Jiménez *et al.* (2005) demostraron que al disminuir la velocidad específica de crecimiento se sintetizan alginatos de mayor peso molecular. Estas evidencias indican

que la velocidad específica de crecimiento, independiente de cómo sea manipulada, determina el peso molecular del alginato sintetizado por *A. vinelandii*.

El PMP del alginato obtenido en la etapa de alimentación con la cepa ATCC 9046 varió considerablemente permitiendo sintetizar alginatos con mayor peso molecular, posiblemente debido a una mayor limitación en su velocidad de crecimiento. A pesar de que aun cuando no hay una explicación clara al respecto, el efecto observado es un indicio de la complejidad en la regulación del peso molecular del alginato producido por *A. vinelandii*. Una hipótesis que podría explicar la influencia de μ sobre el peso molecular del alginato, es atribuido a una posible competencia por intermediarios esenciales involucrados, tanto en la biosíntesis de la pared celular, así como en la biosíntesis de exopolisacárido (Horan *et al.*, 1981), esto sugiere que al limitar la μ habría un incremento del peso molecular debido a la disponibilidad de intermediarios comunes.

8.9 Análisis reológico del alginato obtenido durante los cultivos alimentados

La viscosidad es un parámetro fisicoquímico que se considera importante para el uso y aplicación de los polímeros en la industria. La viscosidad es una característica propia de una macromolécula en un solvente determinado y es dependiente principalmente de su masa molecular, de su estructura y de la concentración del polímero en solución (Clementi *et al.*, 1998). Desde el punto de vista industrial, una de las características más importantes del alginato es su capacidad para formar soluciones viscosas y como agente gelificante. Por lo que se realizó un análisis de las características reológicas de los alginatos obtenidos en los cultivos alimentados. Estos análisis se realizaron en un reómetro con una configuración de cono y plato (ver detalles en Materiales y Métodos, sección 7.2.9).

El alginato utilizado para los análisis reológicos fue reconstituido a una concentración de 5 mg/mL. En la tabla 8.6 se muestra la viscosidad generada por los alginatos sintetizados tanto durante la etapa en lote como los sintetizados durante la alimentación. Como se observa, la viscosidad generada por el alginato sintetizado por la cepa silvestre fue superior en comparación con el alginato sintetizado por la mutante AT6, durante el transcurso de la fermentación.

Tabla 8.6 Viscosidad generada por la solución de alginato reconstituida. El alginato fue aislado de los cultivos alimentados realizados con la sepa silvestre y la mutante AT6 de *A. vinelandii*.

Etapa del cultivo	Viscosidad (mPa s)*	
	AT6	ATCC 9046
Lote (6 h)	1.2	1.9
Alimentado (28 h)	2.1	2.9
(56,69 h)	3.3	4.9

* γ de 0.5 hasta 1500 s⁻¹

Las soluciones con los alginatos obtenidos bajo estas condiciones de cultivo presentaron viscosidades bajas comparadas con las reportadas en matraz (500 mPa s con concentraciones de 5 g/L de alginato) (Peña *et al.*, 1997; Reyes *et al.*, 2003). Resulta evidente que al cambiar de escala, el alginato obtenido en fermentador presenta una calidad inferior en términos de su capacidad viscosificante (la cual es definida como la viscosidad generada por unidad de concentración de alginato). Por lo que el alginato producido en matraz presenta una mayor calidad con características reológicas de alta viscosidad.

El comportamiento reológico del alginato reconstituido se muestra en la figura 8.10a. Como se observa, los alginatos sintetizados por ambas cepas presentan un comportamiento reológico tipo Newtoniano, Es decir, la viscosidad del fluido permanece constante independientemente del esfuerzo de corte aplicado y donde existe una relación lineal entre el esfuerzo de corte y la velocidad de corte, cuya pendiente representa la viscosidad.

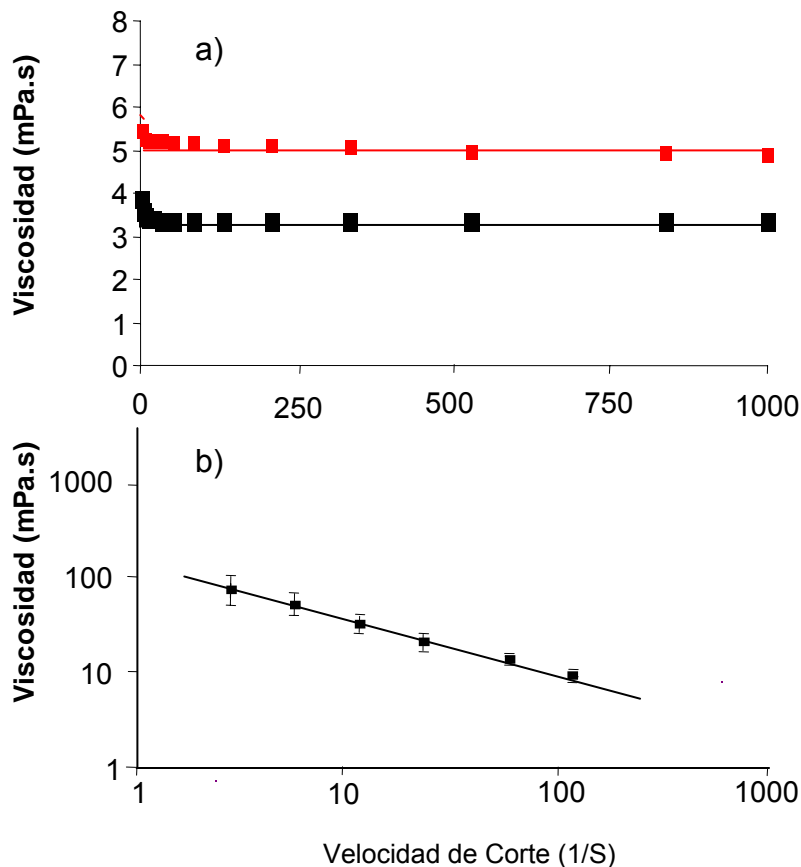


Figura 8.10 Comportamiento reológico del alginato reconstituido que es producido por *A. vinelandii*, durante la etapa de alimentación. a) (■) Cepa Silvestre, alginato aislado a las 56 h; (■) Mutante AT6 alginato aislado a las 69 h. b) Comportamiento reológico del alginato aislado de cultivos en matraz, datos obtenidos por Peña *et al.*, (2006).

Como se observa en la figura 8.10, el comportamiento reológico es completamente diferente al reportado previamente por Peña *et al* (2006). Estos autores reportaron un comportamiento del alginato de tipo reológico pseudoplástico (a una concentración de 1.8 g/L) de alginatos aislados a partir de cultivos realizados a nivel de matraces agitados (Fig. 8.10b), donde la viscosidad depende de la velocidad de corte aplicada y como se observa en la figura 8.10b, la viscosidad disminuye conforme se aumenta la velocidad de corte del fluido.

Si bien, los cultivos de *A. vinelandii* en fermentador permitieron mejorar la producción de alginato, las viscosidades generadas por el polímero son menores en varios órdenes de magnitud. Un aspecto que determina en gran medida las características reológicas del alginato es su peso molecular. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, el peso molecular de los alginatos sintetizados en la etapa de alimentación fue considerablemente alto (similar a los obtenidos en matraz), por lo que las diferencias observadas en la viscosidad, no pueden ser explicados por cambios en el peso molecular del alginato ya que no está impactando directamente.

Es sabido, que la viscosidad puede estar influenciada por el tipo de monómeros de la molécula (relación de gulurónico / manurónico), además el grado de acetilación. Particularmente, se ha observado que el grado de acetilación tiene un efecto importante sobre las características reológicas del cultivo (Peña *et al.*, 2006). Tanto la síntesis del polímero como los cambios en la viscosidad están relacionadas con las condiciones ambientales imperantes en el fermentador. Las bajas viscosidades generadas en el fermentador pueden estar relacionadas con la acetilación de la molécula de alginato así como a posibles cambios en su composición química, sobre todo en la relación de monómeros (ácido gulurónico/ácido manurónico). Posiblemente los periodos de limitación de oxígeno presentes con los cultivos en matraces (ocasionados por la alta velocidad de respiración de la bacteria), pudieran estar impactando directamente en múltiples enzimas como las epimerasas o acetilasas; dando así, un producto con características reológicas completamente diferentes debidas a cambios conformacionales en la molécula del alginato.

9 Conclusiones

- ❖ Durante el crecimiento en matraces agitados bajo condiciones de no-fijación de nitrógeno, la cepa mutante AT6 de *A. vinelandii* presentó un metabolismo “semi-fermentativo” desencadenado como resultado del bloqueo en la síntesis de PHB.
- ❖ El cultivo de la cepa mutante AT6 a nivel de matraces agitados bajo condiciones de fijación de nitrógeno, redujo la respuesta “semi-fermentativa” permitiéndole a la célula continuar con el funcionamiento de las vías oxidativas.
- ❖ Los rendimientos de biomasa con base en la fuente de carbono, fueron superiores para los cultivos con sacarosa, demostrando que es la fuente de carbono que permite soportar un mayor crecimiento de la cepa mutante AT6 a nivel de fermentador bajo condiciones controladas de oxígeno disuelto y pH.
- ❖ La adición de una fuente nitrogenada como el extracto de levadura al medio de cultivo de la cepa AT6, mejoró sensiblemente el rendimiento de la biomasa generada, canalizando preferentemente la fuente de carbono y energía hacia un mayor crecimiento celular a nivel fermentador manteniendo un control riguroso del pH y de la TOD.
- ❖ El pulso de sacarosa y nutrientes durante la etapa de alimentación junto con el cambio en la TOD, permitió incrementar la concentración de alginato.
- ❖ La velocidad específica de crecimiento por debajo de 0.1 h^{-1} , independientemente de cómo sea manipulada, determina el peso molecular del alginato sintetizado por *A. vinelandii*.
- ❖ Mediante el uso de estrategias de biología molecular y bioingeniería fue posible maximizar la producción de alginato sintetizado por la mutante AT6 de *A. vinelandii*, incrementando al doble la producción volumétrica en relación a lo obtenido con la cepa silvestre.

10 Perspectivas

- ❖ Continuar trabajando con cepas modificadas genéticamente, que permitan dilucidar mecanismos para incrementar el peso molecular del alginato sintetizado por *A. vinelandii*.

- ❖ Realizar estudios de vías metabólicas que permitan comprender los efectos de mutaciones en cuanto a la formación del producto con características químicas específicas.

11 Referencias

- Anderson, A. J., Dawes, E. A. (1990). Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.* 54: 450-472.
- Annison, G., Couperwhite, L. (1986). Effect of limiting substrate concentration, growth rate and aeration on alginate composition and production by *Azotobacter vinelandii* in continuous culture. *Food Hydrocolloids* 1: 101-111.
- Bertsova, Y., Bogachev, V., Skulachev V. (1998). Two NADH: ubiquinone oxidoreductases of *Azotobacter vinelandii* and their role in the respiratory protection. *Biochim. Biophys Acta.* 1363:125-133.
- Boswell, C. (2002). Producers seek price increases in the nature alginates market. *Chem. Mark. Report.* 262: 10-11.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brivonese, A.C., Sutherland, I.W. (1989). Polymer production by a mucoid strain of *Azotobacter vinelandii* in batch culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 30: 97-102.
- Byrom, D. (1987) Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics. *Trenes. Biotechnol.* 5: 246-250.
- Cevallos, M.A., Encarnación, S., Leija, A., Mora, Y., Mora, J. (1996). Genetic and Physiological Characterization of a *Rhizobium etli* Mutant Strain Unable To Synthesize Poly- β -Hydroxybutyrate. *J. Bacteriol.* 178:1646-54.

- Clementi, F., Paolo, F., Mancini, F., Moresi, M. (1995). Optimal conditions for alginate production by *Azotobacter vinelandii*. *Enzyme Microb. Technol.* 17: 983-988.
- Clementi, F., Mancini, F., Mancini, M., and Moresi, M. (1997). Rheological behaviour of aqueous dispersions of bacterial sodium alginate. In: *Engineering and Food at ICE F7*, Part I. Ed. R. Jowitt, Sheffield Academic Press, Sheffield, pp. E25-28.
- Clementi, F., Mancini, M., Moresi, M. (1998) Rheology of alginate from *Azotobacter vinelandii* in aqueous dispersions. *J. Food Eng.* 36: 51-62.
- Crescenzi, V. (1995). Microbial polysaccharides of applied interest: ongoing research activities in Europe. *Biotechnol. Prog.* 11: 251-259.
- Dalton, H., Postgate, J. (1969). Effect of oxygen on growth of *Azotobacter chroococcum* in batch and continuous culture. *J. Gen. Microbiol.* 54: 463-473.
- Draget, K., Smidsrod, O., Skjåk-Bræk, G. (2001) Alginates from algae. In: Biopolymers. De Baets S, vandamme E, Steinbüchel A (Eds), WILEY-VCH, Volume 6, pgs 215-42
- Encarnación, S., Dun, M. F., Kaethe, W., Mora, J. (1995). Fermentative and aerobic metabolism in *Rhizobium etli*. *J. Bacteriol.* 77:3058-3066..
- Ertesvag, H., Hoidal, H. K., Hals, I. K., Rian, A., Doseth, 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.
- Espín, G. 2002. Biología de *Azotobacter vinelandii*. En: Microbios en línea. <http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/index.html>. ISBN 968-36-8879-9

- Gacesa, P. (1998). Bacterial alginate biosynthesis, recent progress and future prospects. *Microbiol.* 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
- Gorin, P.A., Spencer J.F. (1966). Exocellular alginic acid from *Azotobacter vinelandii*. *Can. J. Chem.* 44: 993-998.
- Horan, N.J., Jarman, T.R., Dawes, E.A. (1981). Effects of carbon source and inorganic phosphate concentration on the production of alginic acid by a mutant of *A. vinelandii* and on the enzymes involved in its biosynthesis. *J. Gen Microbiol.* 185-191.
- Horan, N.J., Jarman, T.R., Dawes, E.A. (1983). Studies of some enzymes of alginic acid biosynthesis in *Azotobacter vinelandii* grown in continuous culture. *J. Gen Microbiol.* 129: 2985-2990.
- Jarman, T.R., Deavin. L., Scolombe, S., Righelato, R.C. (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., Page G. (1984). Energy requirements of microbial exopolysaccharide synthesis. *Arch. Microbiol* 137: 231-235.
- Kim, J. and D. C. Rees. (1994). Nitrogenase and biological nitrogen fixation. *Biochem.* 33:389-397.
- Knutson, C.A., Jeanes, A. (1968). A new modification of the carbazole analysis: application to heteropolysaccharides. *Anal Biochem* 24:470-481.

- Linkerhägner, K., and J. Oelze. (1995). Cellular ATP levels and activity and nitrogenase switchoff upon oxygen stress in chemostat culture of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* 177: 5289-5293.
- Linkerhägner, K., and J. Oelze. (1996). Nitrogenase activity and regeneration of the cellular ATP pool in *Azotobacter vinelandii* adapted to different oxygen concentrations. *J. Bacteriol.* 179: 1362-1367.
- Lloret, L., Barreto, R., Campos, ME., Martinez-Salazar, JM., Moreno, S., Espín, G., Soberón-Chávez, G. (1996). Genetic analysis of the transcriptional arrangement of *Azotobacter vinelandii* alginate biosynthetic genes: identification of two promoters. *Mol Microbiol* 21:449-457
- Linker, A., Jones, A. (1964). Apolysaccharide resembling alginic acid from a *Pseudomonas* microorganism. *Nature* 204: 187-188.
- López-Munguía, A., Brito, E., Galindo, E. (1993). Biopolímeros. En: Biotecnología Alimentaria. García-Garibay, Quintero-Ramírez y López-Munguía (Coordinadores). Ed. Limusa. Cap 13, pp. 423-451.
- Manchal, J., J. Vanderleyden. 2000. The "oxygen paradox" of dinitrogen-fixing bacteria. *Biol. Fertil. Soils.* 30:363-373.
- Mejía, M. (2004). Producción y caracterización química del alginato sintetizado por cepas de *Azotobacter vinelandii* genéticamente modificada. *Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas.* Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Merritt, J., Allard, G., O'Toole L., Swartz R., Licardi, P. (2000). Development and scale-up of a fed-batch process for the production of capsular polysaccharide from *Haemophilus influenzae*. *J Biotechnol.* 81: 189-97.

- Miller, G. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.* 3: 426-428.
- Moe, S., Draget, K., Skjak-Braek, G., Smidsrod, O. (1995). Alginates. In: Food Polysaccharides and their Applications. Stephen A.M., Marcel Dekker (Eds.), New York, pp. 245-286.
- Núñez, C., Leon, R., Guzman, J., Espín, G., Soberon-Chavez, G. (2000). Role of *Azotobacter vinelandii* mucA and mucC gene products in alginate production. *J. Bacteriol.* 182: 6550–6556.
- Otterlei, M., Ostgeerd, K., Skajak-Braek, G., Smidsrod, O., Soom-Shinog, P., Espevik, T. (1991). Introduction of cytokine production from human monocytes stimulated with alginate. *J. Immunoter.* 10: 286-291.
- Parente, E., Crudele, MA., Aquino, M., Clementi, F. (1998). Alginate production by *Azotobacter vinelandii* DSM576 in batch fermentation. *J Ind Microbiol Biotechnol*; 20:171–6.
- 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. (1998). Producción de alginatos bacterianos por fermentación líquida: estudio de los factores determinantes en la biosíntesis y composición del alginato producido por *Azotobacter vinelandii*. Tesis de Doctorado. Instituto de Biotecnología. UNAM.
- Peña, C., Trujillo-Roldán, M.A., Galindo, E. (2000). Influence of dissolved oxygen tension and agitation speed on alginate production and its molecular weight in cultures of *Azotobacter vinelandii*. *Enzyme Microb.Technol.* 27: 390-398.

- Peña, C., Miranda, L., Segura, D., Nuñez, C., Espin, G., Galindo, E. (2002). Alginate production by *Azotobacter vinelandii* mutants altered in poly-beta-hydroxybutyrate and alginate biosynthesis. *J Ind. Microbiol. Biotechnol.* 29: 209-213.
- Peña, C., Hernández, L. and Galindo, E. (2006). Manipulation of the acetylation degree of *Azotobacter vinelandii* alginate by supplementing the culture medium with 3-(N-morpholino)-propane-sulfonic acid. *Appl Microbiol.* 43: 200-204.
- Pindar, D. F., Bucke, C. (1975). The biosynthesis of alginic acid by *Azotobacter vinelandii*. *Biochem. J.* 152:617-622.
- Priego-Jiménez, R., Peña, C., Ramírez, O. T., Galindo, E. (2005). Specific growth rate determines the molecular mass of the alginate produced by *Azotobacter vinelandii*. *Biochen. Eng. J.* 25: 187-193.
- Poole, R., Hill, S. (1997). Respiratory protection of nitrogenase activity in *Azotobacter vinelandii* roles of the terminal oxidases. *Biosci. Rep.* 17:303-31.
- 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
- Ramírez, O. T., Zamora, R., Quintero, R., López-Munguía A. (1994). Exponentially fed-batch cultures as an alternative to chemostats: the case of penicillin acetylase production by recombinant *E. coli*. *Enzyme and Microbiol Tech.* 16: 895-903.
- Rehm, HA., Valla, S. (1997). Bacterial alginates: biosynthesis and applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 178: 5884–5889.
- Reyes, C., Peña, C. and Galindo, E. (2003). Reproducing shake flasks performance in stirred fermentors: production of alginates by *Azotobacter vinelandii*. *J. Biotechnol* 105: 189-198.

- Sabra, W., 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 microbiaerobic conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52: 773-780.
- Sabra, W., Zeng, H., Lunsdorf, H., Deckwer, W.D. (2000). Effect of oxygen on formation and structure of *Azotobacter vinelandii* alginate and its role in protecting nitrogenase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 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.
- Segura, D., Vargas, E., Espín, G. (2000). β - Ketothiolase genes in *Azotobacter vinelandii*. *Gene* 2000: 113-120.
- Segura, D., Cruz, T., Espín, G. (2003a). Encystment and alkylresorcinol production by *Azotobacter vinelandii* strains impaired in poly- β -hydroxybutyrate synthesis. *Arch Microbiol.* 179: 437–443.
- Segura, D., Guzmán, J., Espín, G. (2003b). *Azotobacter vinelandii* mutants that overproduce poly- β -hydroxybutyrate or alginate. *Appl Microbiol Biotechnol* 63: 159–163.
- Senior, P.J., Dawes, E.A. (1971). Poly- β -hydroxybutyrate biosynthesis and the regulation of glucose metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. *Biochem J.* 125 (1):55–66.
- Senior, P. J., Beech, G.A., Richie, G.A., Dawes, E.A. (1972). The role of oxygen limitation in the formation of poly- β -hydroxybutyrate during batch and continuous culture of *Azotobacter beijerinckii*. *Biochem. J.* 128: 1193-1201.

- Skjak-Braek, G. (1992). Alginates: biosyntheses and some structure–function relationships relevant to biomedical and biotechnological applications. *Biochem Plant Polysaccharides*. 20:27–33.
- Smidsroad, O., Draget, KI. (1996). Chemistry and physical properties of alginates. *Carbohydr Eur* 14: 6-13.
- Sutherland, IW. (1977). Microbial exopolysaccharide synthesis. In: Sandford PA, Laskin A (ED) Extracellular Microbial Polysaccharides. American Chemical Society, Washington DC.
- Sutherland. I., (1990). Journal of Applied Microbiology. Ed. Cambridge University Press. Gran Bretaña, pp. 12-38.
- Tinoco, JR. (1993). Obtención de alginatos bacterianos por fermentación líquida de *Azotobacter vinelandii*. Tesis de Maestría. Instituto de Biotecnología, UNAM.
- Trujillo-Roldán, M., (2001a). Efecto de las oscilaciones en el oxígeno disuelto sobre la producción de alginatos por *Azotobacter vinelandii*. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Instituto de Biotecnología, UNAM.
- Trujillo-Roldán, M., Peña, C., Ramirez, O.T., Galindo, E. (2001b). 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
- Yamame, T., K. Shimizu, S. (1984). Fed-batch techniques in microbial processes. *J of Biochem Engineer and Biotechno.* 30:145-194
- Youssef, F., Roukas, T., Biliaderis, C. (1999). Pullulan production by a non-pigmented strain of *Aureobasidium pullulans* using batch and fed-bach culture. *Process Biochem.* 34: 355-366.