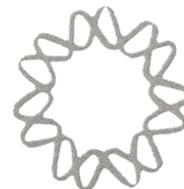




Universidad Nacional Autónoma de México



Instituto de Biotecnología

Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis

“Caracterización cinética, química y reológica de alginatos sintetizados bajo condiciones de cultivo diazotróficas y no diazotróficas por la mutante ATCN4 de *Azotobacter vinelandii*”

T E S I S

Que para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

Presenta

Ing. Al. Itzel Gaytán Enríquez

Tutor: Dr. Enrique Galindo Fentanes

Co- Tutor: Dr. Carlos Peña Malacara



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. Enrique Galindo y 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 (DGAPAUNAM) a través del proyecto 57220, así como el apoyo de la beca CONACYT.

La posibilidad de realizar un sueño es lo que hace que la vida se vuelva interesante...

Paulo Coelho

AGRADECIMIENTOS

Académicos:

Al Dr. Enrique Galindo Fentanes, por la oportunidad de formar parte de su grupo y más aún por dejarme ser parte de los alginatos, brindándome siempre su apoyo y paciencia para el desarrollo de este trabajo. Al final de este tiempo, agradezco infinitamente la formación que me dio.

Al Dr. Carlos Felipe Peña Malacara, agradezco el tiempo dedicado, las ideas, las discusiones, el enriquecimiento constante de este trabajo y por supuesto su paciencia y confianza.

A los miembros de mi comité tutorial: Dr. Daniel Segura y Dr. Edmundo Castillo, por su valiosa colaboración.

A los miembros del jurado:

- Dra. Cinthia Ernestina Núñez López
- Dr. Mario Soberón Chávez
- Dr. José Adelfo Escalante Lozada
- Dr. Ángel Romo-Uribe
- Dr. Rafael Vázquez Duhalt

Porque su revisión crítica, comentarios y sugerencias, ayudaron a concluir este trabajo abriendo nuevas perspectivas respecto al tema.

Con mucho cariño agradezco a la Dra. Marisol Córdova Aguilar, por algo más que el apoyo técnico en el uso del reómetro...

¡¡¡G R A C I A S!!!



Personales:

Porque la Maestría también implica emociones, agradezco enormemente...

A Esteban Lozano, por su apoyo incondicional en el uso del reactor, por esas noches de fermentación y tacos...por su amistad.

A mi “amiguinio” Axel Falcón, por el chip, por los tornillos, por componer todos los aparatos que descompuse, por su apoyo moral en mis momentos difíciles, por hacerme reír tanto ☺ ☺ ☺, por su amistad y cariño.

A Sol, por ser mi mejor ejemplo de una mujer FUERTE, gracias a Dios por ponerla en mi camino.

Agradezco con AMOR a Miguel M, por su asesoría en los aspectos técnicos de mi trabajo, por las revisiones críticas que hizo siempre a mis escritos, por los gratos momentos que pasamos y ayudaron a escribir nuestra historia, pero sobre todo... por enseñarme que la Ciencia va más allá de los experimentos.

Porque mi trabajo no tendría sentido sin ellos...

A Dios, gracias.

A mis papás: Ma. Delia Enríquez Dircio, Jaime Gaytán Rivera, Cristina Dircio y Ranulfo Enriquez, agradezco ante todo por su AMOR, por todas esas noches de desvelo que han vivido con migo, por enseñarme que el conocimiento, es la única manera de ser libre!

A mi tía... Aracely Enríquez Dircio, por su amor y cuidados físicos y espirituales.

A mi nueva familia: Kary, Ricardo, María de la Paz y Hugo, quizá no lo sepan pero sus palabras han sido un gran apoyo que me permitió cerrar esta etapa.

A mis amigos de toda la vida: Vanessa y Adolfo Macías Valencia, Luis A. Franco y Mercedes Perez Flores, porque a pesar de todas esas salidas canceladas debido a “La Maestría”, siguen ahí brindándome su cariño y amistad.

Finalmente, dedico con mucho AMOR esta etapa de mi vida y todo lo que implicó a mis dos ángeles guardianes: Meztli y Ángel Gaytán Enríquez.

Nomenclatura

| Símbolo | Significado | Unidades |
|----------------|---|---------------------|
| ATCC | American Type Culture Collection | --- |
| G | Gulurónico | --- |
| M | Manurónico | --- |
| G/M | Relación ácido gulurónico/ácido manurónico | --- |
| MOPS | Ácido 3-N-morfolino propanosulfónico | --- |
| PHB | Poli- β -hidroxibutirato | --- |
| IP | Índice de polidispersión | --- |
| PM | Peso molecular | kDa |
| PMP | Peso molecular promedio | kDa |
| qs | Velocidad de consumo de sustrato | g/g*h |
| rpm | Revoluciones por minuto | min ⁻¹ |
| TOD | Tensión de oxígeno disuelto | % |
| $Y_{Alg/X}$ | Rendimiento de alginato por unidad celular | g/g |
| $Y_{Alg/S}$ | Rendimiento de alginato con base a sacarosa | g/g |
| $Y_{X/S}$ | Rendimiento de biomasa con base a sacarosa | g/g |
| μ | Velocidad específica de crecimiento | h ⁻¹ |
| μ_{ap} | Viscosidad aparente | mPa*s |
| K | Índice de consistencia | mPa*s ⁿ |
| n | Índice de flujo | --- |
| $\dot{\gamma}$ | Gradiente de deformación | s ⁻¹ |
| ω | Frecuencia angular | rad*s ⁻¹ |
| G' | Módulo elástico o módulo de almacenamiento | Pa |
| G'' | Módulo viscoso o módulo de pérdida | Pa |
| G^* | Módulo complejo | Pa |

Índice general

| | Página |
|--|---------------|
| Resumen | 1 |
| 1 Introducción | 3 |
| 2 Antecedentes | 5 |
| 2.1 Generalidades del alginato | 5 |
| 2.2 Características químicas de los alginatos | 6 |
| 2.2.1 Estructura | 6 |
| 2.2.2 Peso molecular y distribución del peso molecular | 6 |
| 2.2.3 Acetilación | 7 |
| 2.3 Propiedades funcionales de los alginatos | 8 |
| 2.3.1 Capacidad viscosificante | 8 |
| 2.3.2 Capacidad gelificante | 9 |
| 2.4 Aplicaciones de los alginatos | 11 |
| 2.5 Alginatos microbianos | 12 |
| 2.5.1 <i>A. vinelandii</i> | 13 |
| 2.5.2 Biosíntesis del alginato y PHB | 13 |
| 2.5.3 Función biológica del alginato | 15 |
| 2.6 Cultivos de <i>A. vinelandii</i> | 16 |

| | |
|---|----|
| 2.6.1 Matrices como biorreactores para el cultivo de <i>A. vinelandii</i> | 16 |
| 2.7 Mutantes de <i>A. vinelandii</i> | 17 |
| 2.7.1 Mutante ATCN4 de <i>A. vinelandii</i> | 19 |
| 3 Justificación | 21 |
| 4 Hipótesis | 21 |
| 5 Objetivo general | 22 |
| 6 Objetivos específicos | 22 |
| 7 Estrategia experimental | 23 |
| 8 Materiales y métodos | 25 |
| 8.1 Microorganismo, medio de cultivo y condiciones de crecimiento | 25 |
| 8.1.2 Inóculo | 25 |
| 8.2 Condiciones de operación | 25 |
| 8.3 Métodos analíticos | 26 |
| 8.3.1 Determinación de la biomasa por gravimetría | 26 |
| 8.3.2 Determinación de la biomasa por turbidimetría | 26 |
| 8.3.3 Determinación de proteína por el método de Lowry | 27 |
| 8.3.4 Extracción y cuantificación del alginato | 28 |
| 8.3.5 Determinación del consumo de sacarosa (<i>DNS</i>) | 28 |

| | |
|---|-----------|
| 8.3.6 Determinación del peso molecular por HPLC | 29 |
| 8.3.7 Determinación de la relación gulurónicos/manurónicos | 30 |
| 8.3.8 Determinación espectrofotométrica de la pureza del alginato | 31 |
| 8.3.9 Determinación del grado de acetilación por HPLC-UV | 31 |
| 8.2.10 Determinación de PHB por HPLC-UV | 32 |
| 8.2.11 Determinación de la viscosidad aparente | 33 |
| 8.3.12 Determinación de las propiedades viscoelásticas | 34 |
| 8.3.13 Cálculo de los parámetros cinéticos y estequiométricos | 34 |
| 9 Resultados | 37 |
| 9.1 Caracterización cinética | 37 |
| 9.1.1 Crecimiento celular | 37 |
| 9.1.2 Acumulación de PHB | 43 |
| 9.1.3 Biosíntesis de alginato | 44 |
| 9.1.4 Consumo de sacarosa | 47 |
| 9.2 Caracterización química | 51 |
| 9.2.1 Grado de acetilación | 51 |
| 9.1.2 Peso molecular promedio del alginato | 53 |
| 9.2.3 Distribución del peso molecular del alginato | 54 |

| | |
|---|-----------|
| 9.2.4 Relación Gulurónicos/Manurónicos (G/M) | 56 |
| 9.3 Caracterización reológica de caldos de fermentación y soluciones reconstituidas de alginato. | 58 |
| 9.3.1 Viscosidad de los caldos de fermentación | 58 |
| 9.3.2 Propiedades viscoelásticas de alginatos en solución | 64 |
| 9.4 Análisis tecnológico de los alginatos sintetizados por las cepas ATCC 9046 y ATCN4. | 68 |
| 10 Discusión | 71 |
| 11 Conclusiones | 86 |
| 12 Perspectivas | 87 |
| 13 Referencias | 88 |
| 14 Anexo | 97 |

Índice de figuras

| Figura | | Página |
|--------|---|--------|
| 2.1 | Características estructurales del alginato. | 6 |
| 2.2 | Estructura del alginato tipo “caja de huevo”. | 10 |
| 2.3 | Ruta biosintética de alginato y PHB en <i>A. vinelandii</i> . | 15 |
| 2.4 | Estructura del complejo multienzimático Na ⁺ -NQR. | 19 |
| 7.1 | Estrategia experimental del proyecto. | 24 |
| 8.1 | Curva patrón para la determinación de biomasa para la cepa ATCC 9046. | 26 |
| 8.2 | Curva patrón para la determinación de biomasa para la cepa ATCN4. | 27 |
| 8.3 | Curva patrón para la determinación de proteína por el método de Lowry. | 28 |
| 8.4 | Curva patrón para la determinación de sacarosa. | 29 |
| 8.5 | Curva patrón para la determinación de ácido manurónico. | 30 |
| 8.6 | Curva patrón para la determinación de la concentración de alginato. | 31 |
| 8.7 | Curva patrón para la determinación de acetilos. | 32 |
| 8.8 | Curva patrón para la determinación de ácido crotónico. | 33 |
| 9.1 | Cinética de crecimiento celular con base a peso seco bajo condiciones no diazotróficas. | 38 |
| 9.2 | Concentración máxima de biomasa sintetizada por diferentes cepas mutantes de <i>A. vinelandii</i> . | 39 |
| 9.3 | Fotografías al microscopio óptico de la cepa silvestre ATCC 9046 y mutante ATCN4. | 39 |
| 9.4 | Cinética de crecimiento celular con base a proteína bajo condiciones no diazotróficas. | 40 |
| 9.5 | Cinética de crecimiento celular con base a peso seco bajo condiciones diazotróficas. | 41 |
| 9.6 | Cinética de crecimiento celular con base proteína bajo condiciones diazotróficas. | 41 |
| 9.7 | Concentración máxima de proteína sintetizada bajo condiciones no diazotróficas y diazotróficas. | 42 |

| | | |
|------|--|----|
| 9.8 | Cinética de producción de PHB bajo condiciones diazotróficas y no diazotróficas. | 43 |
| 9.9 | Cinética de producción de alginato bajo condiciones diazotróficas y no diazotróficas. | 45 |
| 9.10 | Rendimientos por unidad celular de las cepas ATCN4 y ATCC 9046 cultivadas bajo condiciones de cultivo diazotróficas y no diazotróficas. | 46 |
| 9.11 | Consumo de sacarosa bajo condiciones no diazotróficas y diazotróficas | 48 |
| 9.12 | Rendimientos con base a sacarosa en la fase exponencial de crecimiento bajo condiciones no diazotróficas y diazotróficas. | 49 |
| 9.13 | Evolución en el grado de acetilación del alginato sintetizado bajo condiciones no diazotróficas y diazotróficas. | 52 |
| 9.14 | Evolución en el peso molecular promedio del alginato sintetizado bajo condiciones no diazotróficas y diazotróficas. | 53 |
| 9.15 | Distribución de peso molecular e índices de polidispersión del alginato sintetizado a condiciones no diazotróficas y diazotróficas. | 55 |
| 9.16 | Evolución de la relación ácido gulurónico/ácido manurónico (G/M) del alginato sintetizado bajo condiciones diazotróficas y no diazotróficas. | 57 |
| 9.17 | Reograma de viscosidad aparente de caldos de fermentación, obtenidos de cultivos no diazotróficos con la cepa ATCN4. | 59 |
| 9.18 | Evolución de los parámetros reológicos K y n de los caldos de fermentación a lo largo del cultivos bajo condiciones no diazotróficas y diazotróficas. | 60 |
| 9.19 | Influencia de la concentración de alginato sobre los parámetros reológicos K y n de los caldos de fermentación a lo largo del cultivos no diazotróficos y diazotróficos. | 61 |
| 9.20 | Índices de consistencia (K) de los caldos de fermentación y propiedades químicas de los alginatos a diferentes concentraciones del polímero. | 63 |
| 9.21 | Espectros mecánicos, dependencia del módulo de almacenamiento (G') y módulo perdida (G'') sobre la frecuencia angular (ω) de soluciones de alginato. | 65 |

Índice de tablas

| Tabla | | Página |
|-------|--|--------|
| 2.1 | Propiedades funcionales y usos industriales de los alginatos. | 11 |
| 2.2 | Cepas mutantes de <i>A. vinelandii</i> , nivel de al que han sido evaluadas y parámetros determinados a los alginatos que sintetizan. | 18 |
| 9.1 | Constantes de Luedeking Piret y porcentaje de alginato sintetizado en cada etapa de crecimiento celular. | 47 |
| 9.2 | Comparación del módulo complejo (G^*) de distintos sistemas poliméricos. | 66 |
| 9.3 | Parámetros de producción de alginato y características químicas de los alginatos sintetizados por la cepa silvestre ATCC 9046 y la cepa mutante ATCN4. | 69 |

Resumen

El alginato es un polímero lineal conformado por el ácido α -L-gulurónico(G) y su epímero el ácido β -D-manurónico (M). Gracias a sus propiedades fisicoquímicas se emplea en diferentes sectores industriales como agente gelificante, viscosificante y estabilizante. Actualmente, la industria farmacéutica ha mostrado un particular interés en los alginatos debido a que su composición química y arreglo secuencial de monómeros se ha relacionado con efectos biológicos relevantes, como el hecho de que polímeros con alto contenido de ácido manurónico inducen la producción de citocinas y estimulan receptores. También se ha demostrado que los oliguluronatos modifican transitoriamente estructuras de mucina, abriendo posibilidades para el tratamiento de algunas enfermedades respiratorias (Draget y Taylor, 2011). Dichos efectos biológicos, han derivado en una demanda de alginatos cada vez más específicos y con alto grado de pureza. Sin embargo, los alginatos comerciales se sintetizan a partir de algas marinas, por lo que su composición varía ampliamente dependiendo de las especies e incluso de los diferentes tejidos de que se extraen, limitando la producción de este tipo de polímeros. Como alternativa para su producción se ha evaluado la síntesis alginatos a partir de bacterias como *Azotobacter vinelandii*, debido a la posibilidad que ofrecen de sintetizar polímeros con características moleculares definidas. Para lograrlo se han diseñado numerosas estrategias que combinan principalmente dos áreas de investigación, la bioingeniería y la biología molecular. En la primera, se han modificado diversos parámetros de fermentación como la composición del medio de cultivo, la temperatura, el pH, la tensión de oxígeno disuelto (TOD) y el pH. Mientras que en la segunda se han elucidado los aspectos regulatorios de la genética microbiana, así como la ruta biosintética de los alginatos. No obstante, la producción industrial de alginatos microbianos aún no ha sido posible debido a que los rendimientos máximos alcanzados hasta ahora no son suficientes para competir con otros polímeros comerciales. Por otro lado, se ha considerado que participar en el mercado compitiendo por calidad más que por precio para satisfacer sectores que requieren alginatos de alta calidad, como el farmacéutico, podría hacerlos eventualmente competitivos en el mercado. Atendiendo lo anterior expuesto, el presente trabajo propone el uso de una cepa mutante a fin de caracterizar cinética, química y reológicamente a los alginatos que sintetiza bajo diferentes condiciones de crecimiento. Específicamente se trabajó con la mutante ATCN4 de *A. vinelandii* cultivada tanto en ambiente diazotrófico (fijación de nitrógeno atmosférico) como no diazotrófico. Esta cepa posee una mutación en el gen *nqrE* que codifica para una subunidad de la NADH: Ubiquinona oxidoreductasa translocadora de sodio (Na^+ -NQR). La primera etapa de la caracterización cinética permitió demostrar que al cultivar a esta cepa bajo condiciones diazotróficas, no sólo consume una baja concentración de la fuente de carbono (7 g/L) en comparación a la cepa silvestre (10.8 g/l), sino que además es capaz de metabolizarla de una manera muy eficiente, permitiendo la obtención de rendimientos globales con base a sacarosa 2.7 veces más altos en relación con los de la cepa silvestre; estos rendimientos se tradujeron en una mejor producción de alginato, un mayor crecimiento celular y una mayor acumulación de PHB.

Respecto a la caracterización química, destaca el hecho de que los alginatos sintetizados por la cepa mutante se encuentran no acetilados o con un menor grado de acetilación (4 %) en comparación a los de la cepa silvestre (12 %), dependiendo del ambiente donde se haya desarrollado la bacteria. Así mismo, la determinación del peso molecular permitió observar que mientras el alginato de la cepa

ATCN4 extraído de condiciones no diazotróficas es muy similar al de la cepa silvestre, el polímero sintetizado en diazotrofia por la cepa ATCN4 presentó el peso molecular más alto reportado hasta ahora (~ 2300 kDa) para cultivos en matraces. Otra característica determinada fue la relación G/M, los resultados mostraron que los cultivos no diazotróficos con la cepa mutante, permiten la síntesis de polímeros conformados principalmente por residuos de ácido G a diferencia de los productos sintetizados por la cepa silvestre.

Finalmente, se realizó la evaluación funcional de los alginatos en términos de sus propiedades reológicas, corroborando el comportamiento no Newtoniano del tipo pseudoplástico propio de los alginatos en solución. En el análisis del índice de consistencia (K) se encontró que para una misma concentración de alginato e independientemente de las condiciones ambientales, los polímeros de la cepa silvestre confieren una mayor calidad reológica en comparación a los sintetizados por la cepa mutante. La determinación de las propiedades viscoelásticas de soluciones de alginato (2 %), demostró el potencial de los alginatos bacterianos en comparación a los productos algales, debido a que los polímeros sintetizados por las cepas ATCN4 (bajo condiciones diazotróficas) y ATCC 9046 (bajo condiciones no diazotróficas) superan hasta 4 veces la G^* obtenida para los alginatos algales.

1. INTRODUCCIÓN

Los alginatos son heteropolímeros lineales formados por ácido M y su epímero (C-5) ácido G unidos por enlaces β (1 \rightarrow 4) (Espín, 2002). Actualmente son extraídos de algas marinas cafés (*Phaeophyceae*). La obtención de alginatos a partir de estas fuentes depende de la estacionalidad y de las condiciones ambientales, por lo que presentan composiciones muy variadas (Clementi, 1997). Estos polímeros son también sintetizados por bacterias de los géneros *Azotobacter* y *Pseudomonas*. *Azotobacter vinelandii* se ha empleado como modelo de estudio para la síntesis de alginatos debido a la ausencia de patogenicidad y a que cuando se cultiva en presencia de iones calcio sintetiza largas cadenas de ácido G (Parente *et al*, 1998).

Desde un punto de vista comercial, las capacidades gelificantes y viscosificantes son las propiedades más importantes de los alginatos ya que determinan su funcionalidad y aplicación en industrias como la alimentaria, textil, farmacéutica, biomédica y biotecnológica (Clementi, 1997).

La biología molecular juega un papel relevante en el estudio de los alginatos, dado que ha permitido realizar estudios encaminados a la obtención de cepas mutantes de *A. vinelandii* capaces de sobreproducir el polímero (Peña *et al*, 2002; Segura *et al*, 2003; Núñez *et al*, 2009), también ha hecho posible crear cepas productoras de alginatos con características químicas específicas (Peña *et al*, 2002), así como evitar efectos indeseables en la degradación del alginato, lo cual permitiría la síntesis de un producto de mayor uniformidad en términos de los pesos moleculares (Trujillo-Roldán *et al*, 2003).

El empleo de herramientas de bioingeniería ha permitido evaluar los alcances tecnológicos de las cepas mutantes de *A. vinelandii* en términos de la capacidad de producción de alginatos y de su crecimiento celular, mediante el control de variables de fermentación como temperatura, pH, TOD, velocidades de agitación y suministro de nutrientes. En este sentido, se encontró que la TOD es uno de los parámetros críticos más importantes en la síntesis de alginatos por *A. vinelandii*. Peña *et al* (2000) reportaron la influencia del oxígeno disuelto sobre la concentración y composición del polímero, estableciendo que *A. vinelandii* produce eficientemente alginatos en niveles de oxígeno de entre 3 y 5 %.

A pesar de los numerosos estudios realizados no se ha logrado que los alginatos microbianos sean una opción viable para su aplicación industrial en términos de producción volumétrica. Sin embargo, el interés actual radica principalmente en la creación de alginatos microbianos de alta pureza, químicamente definidos y con propiedades funcionales atractivas para diversas aplicaciones

industriales. Por ello es necesario continuar investigando las posibilidades que ofrecen la biología molecular para la generación de cepas mutantes productoras de alginatos específicos, así como la bioingeniería, mediante el control y manipulación de las diferentes variables de fermentación.

2. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades del alginato

Los alginatos forman una familia de biopolímeros de interés científico e industrial. Estos polímeros son polisacáridos lineales compuestos de cantidades variables de ácido M y ácido G. En el año de 1881, el científico británico Stanford describió la existencia de alginatos en algas marinas cafés, localizados en la matriz intracelular conformando más del 40 % de la materia seca. Actualmente, los alginatos comerciales son extraídos de algas marinas como *Laminaria hyperborea*, *L. digitata*, *L. japonica*, *Macrocystispyrifera*, *Ascophyllum nodosum*, entre otras (Clementi, 1997; Rehm y Valla, 1997; Sabra *et al*, 2001).

La mayor producción de alginatos se da en los Estados Unidos de Norte América (10 000 a 12 000 ton/año), seguido de China (8 000 a 10 000 ton/año), 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 que se consumen en Estados Unidos, el 60 % se destina al sector alimentario, 20 % al farmacéutico, 10 % se emplea en la industria del papel y 10 % en la industria textil (Boswell, 2002). Para el caso de México la principal fuente de alginatos es *Macrocystis pyrifera*; sin embargo y debido a la falta de inversión, se exporta en fresco a Estados Unidos de Norte América para ser procesada (Zertuche-González, 1994). A pesar de que los precios de los alginatos algales son relativamente bajos (\$5-\$20 dólares/Kg), los precios de los polímeros de mayor pureza, utilizados principalmente en la industria farmacéutica, llegan a alcanzar los \$40 000 dólares por kilogramo (Sabra *et al*, 2001).

La composición química y la secuencia de los alginatos algales varían ampliamente entre diferentes especies de algas e incluso entre el tipo de tejido del que se extraen. Asimismo, son altamente dependientes de las condiciones ambientales donde se desarrolle el alga, edad y técnica de extracción (Draget *et al*, 2002). Es por ello que su uso en industrias donde se requieren alginatos con características químicas definidas y/o con altos pesos moleculares ha sido limitado. Por esta razón, se ha investigado la producción de alginato a partir de sistemas microbianos, ya que no únicamente ofrecen la ventaja de sintetizar polímeros de composición uniforme, sino que además es posible manipular al microorganismo mediante técnicas moleculares para generar alginatos con características específicas.

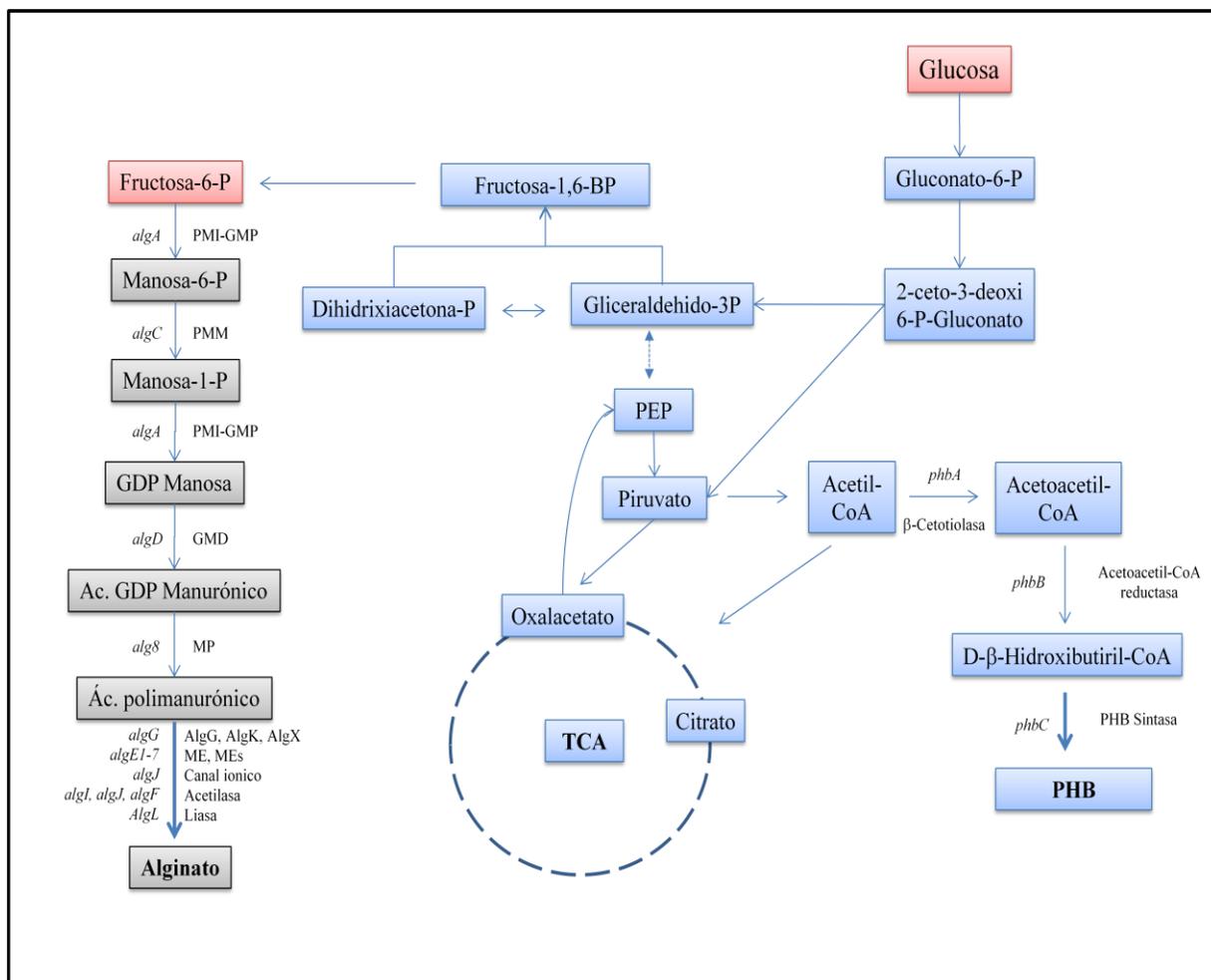


Figura 2.3. Ruta biosintética de alginato y PHB en *A. vinelandii*.

2.5.3 Función biológica del alginato

En células metabólicamente activas de *Azotobacter*, el alginato es producido como un exopolisacárido. El polímero, que es producido en células vegetativas no diferenciadas, forma películas que le permiten adherirse a las superficies. Se cree que la acumulación extracelular del alginato actúa como una barrera contra la difusión de oxígeno, metales pesados o como protección a condiciones adversas del medio ambiente (Sabra *et al*, 2001). El alginato también forma parte de las dos capas que conforman a los quistes maduros: exina e intina, de las cuales el 32 y 13 %, respectivamente, de su peso seco es alginato. La cubierta que forma el alginato protege a las células latentes de la desecación y el estrés mecánico. Bajo condiciones favorables de crecimiento, la cubierta de alginato se hidrata y los quistes germinan, se dividen y regeneran a células vegetativas (Skjak-Braek, 1992).

aún no ha sido caracterizada la relación de bloques monoméricos (G/M) ni sus propiedades viscoelásticas, siendo éste último parámetro de gran relevancia dado que describen las características mecánicas de los geles de alginato.

Lo anterior refleja la necesidad de realizar estudios más detallados de los alginatos producidos por cepas mutantes de *A. vinelandii* a fin de proponer alternativas prácticas, ya que el mercado actual y futuro de los alginatos demanda productos con alto valor agregado, que exhiban una alta pureza y posean características moleculares definidas para hacerlos eventualmente competitivos.

2.7.1 Mutante ATCN4 de *A. vinelandii*

La NADH ubiquinona oxidoreductasa translocadora de sodio (Na^+ -NQR) es una bomba de sodio compuesta por seis subunidades estructurales conocidas como NqrA-F (figura 2.4). Estas subunidades están codificadas en el operón *nqr* (Nakayama *et al*, 1998; Häse y Barquera, 2001). Los organismos que expresan el complejo enzimático Na^+ -NQR son principalmente bacterias marinas como *Vibrio cholerae* y *Vibrio alginoliticus*, aunque también se ha encontrado ampliamente distribuido en microorganismos patógenos como *P. aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Yersinia pestis*, entre otras (Skulachev, 1989; Häse y Barquera, 2001; Verkhovsky y Bogachev, 2010).

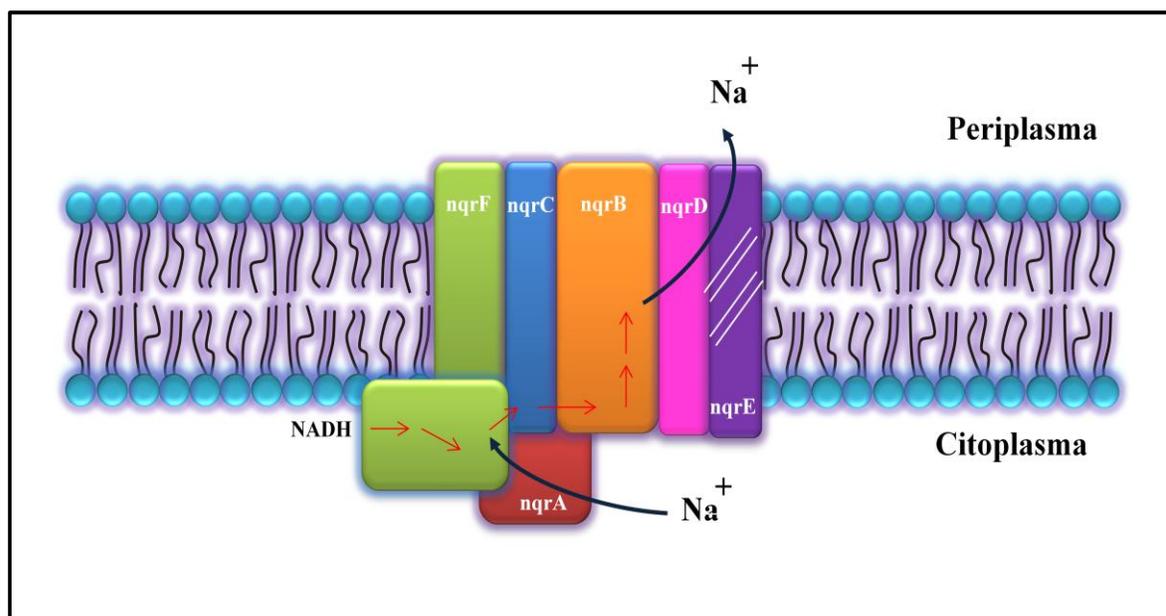


Figura 2.4. Mutación en el complejo enzimático Na^+ -NQR. Imagen tomada de Juárez y Barquera, 2012.

La función principal de esta enzima es la de acoplar la oxidación exergónica del NADH por la ubiquinona al transporte de iones sodio del espacio citoplásmico al espacio extracelular (figura 2.4). En consecuencia disminuye la concentración interna de sodio y contribuye a la generación de un potencial transmembranal de sodio o fuerza sodio motriz (SMF), la cual es utilizada para realizar trabajo metabólico como el movimiento flagelar, expresión de factores de virulencia, síntesis de ATP e importe de solutos (Skulachev, 1989; Häse y Barquera, 2001; Núñez *et al*, 2009).

A pesar de que *A. vinelandii* no es una bacteria marina o patógena, posee el complejo enzimático Na⁺-NQR. Se sabe que en este microorganismo la Na⁺-NQR es la principal bomba de sodio y que en conjunto con otras dos oxidoreductasas (NDH I y NDH II) constituyen las NADH deshidrogenasas que inician la cadena respiratoria. Núñez *et al* (2009) encontraron que la inserción de un mTn5 (minitransposon) en el operón *nqr* incrementa la síntesis de alginatos en *A. vinelandii*. La mutante *nqr::Tn5*, llamada ATCN4 se cultivó en medio sólido y bajo condiciones diazotróficas, donde produjo aproximadamente cuatro veces más alginato respecto a la cepa silvestre (800 µg alg/ mg proteína para la cepa silvestre vs 3400 µg alg/ mg de proteína para la mutante), sugiriendo que la Na⁺-NQR regula negativamente la síntesis de alginato y que la ausencia del gradiente transmembranal de sodio podría ser una señal que desencadena la producción del polímero (Núñez *et al*, 2009). Sin embargo, hasta ahora se desconocen las razones moleculares de dicho efecto.

3. JUSTIFICACIÓN

Los estudios realizados con *A. vinelandii* se han enfocado a elucidar aspectos regulatorios y fisiológicos así como a incrementar la producción volumétrica del alginato. No obstante, dadas las bajas concentraciones de alginato logradas hasta ahora [(10 g/L), (Mejía *et al.*, 2010)] el proceso no ha resultado económicamente viable. A pesar de esto, no se descarta la posibilidad de hacerlos eventualmente competitivos por su calidad, ya que mediante modificaciones genéticas y/o ambientales se espera diseñar polímeros hechos a la medida. En este sentido, se considera importante conocer el tipo de alginato producido por cepas con alguna modificación genética. Por ello, el presente trabajo propone realizar una caracterización del comportamiento cinético de una cepa mutante denominada ATCN4; así mismo evaluar las características químicas y propiedades reológicas de soluciones y geles del alginato sintetizado por esta cepa, esperando que la información generada contribuya a entender el comportamiento intrínseco de la cepa y a evaluar las posibilidades tecnológicas de los polímeros sintetizados bajo las condiciones de cultivo planteadas para este trabajo.

4. HIPÓTESIS

Cultivos líquidos con la cepa mutante ATCN4, afectada en la subunidad E del complejo Na⁺-NQR, permitirán la síntesis de mayores concentraciones de alginatos con características químicas diferentes a las de la cepa silvestre, tales como PMP, grado de acetilación y relación G/M.

5. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar cinética, química y reológicamente los alginatos sintetizados por la mutante ATCN4 de *A. vinelandii* cultivada bajo condiciones diazottróficas y no diazottróficas.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la cinética de crecimiento, producción de alginato y PHB de la cepa ATCN4 en cultivos diazottróficos y no diazottróficos.
- Caracterizar químicamente a los alginatos (peso molecular, relación G/M, grado de acetilación) producidos por la cepa ATCN4 desarrollada en cultivos diazottróficos y no diazottróficos.
- Determinar los parámetros reológicos (índice de consistencia “*K*” e índice de flujo “*n*”) de los caldos de fermentación.
- Evaluar las propiedades viscoelásticas de soluciones de alginato en términos del módulo de almacenamiento (G'), módulo de pérdida (G'') y módulo complejo (G^*).
- Analizar la funcionalidad de los alginatos sintetizados por la cepa silvestre ATCC 9046 y la mutante ATCN4 en relación a la viscosidad y gelificación, así como compararla con los alginatos algales.

7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

El presente trabajo planteó como objetivo realizar una caracterización integral del comportamiento cinético, químico y reológico de los alginatos producidos por la cepa mutante ATCN4, desarrollada en cultivos sumergidos en matraz y bajo condiciones diazotróficas y no diazotróficas. Para ello se diseñó la siguiente estrategia experimental (figura 7.1).

Hasta el momento, el trabajo realizado con la cepa mutante ATCN4 se ha centrado en aspectos de biología molecular, desarrollando cultivos en placa y en ambiente diazotrófico (Núñez *et al*, 2009). Por lo anterior, se planteó una primera etapa que consistió en la evaluación de los diferentes parámetros cinéticos de crecimiento celular, síntesis de productos (alginato y PHB) y consumo de fuente de carbono de la cepa ATCN4, desarrollada en cultivos sumergidos en matraces y bajo condiciones diazotróficas y no diazotróficas.

La segunda etapa consistió en el análisis químico de los alginatos sintetizados, evaluando aspectos como el peso molecular, relación de los ácidos gulurónicos/ácidos manurónicos (G/M), así como el grado de acetilación de los alginatos sintetizados por la mutante ATCN4 bajo las diferentes condiciones de cultivo planteadas. El peso molecular fue determinado por cromatografía de filtración en gel (Peña, 1998), el grado de acetilación se determinó por cromatografía de intercambio iónico, en tanto que la relación (G/M) se estimó por determinaciones colorimétricas (Blumenkrantz y Asboe-Hansen, 1973).

En una tercera etapa, se realizó una caracterización reológica tanto de caldos de fermentación como de soluciones reconstituidas de alginato (2 %). A los primeros se les realizó un barrido de velocidades de deformación determinando la viscosidad, con la finalidad de calcular sus parámetros reológicos, es decir, el índice de consistencia (K) y el índice de flujo (n). Las soluciones reconstituidas de alginato se trabajaron con reología oscilatoria para evaluar su comportamiento viscoelástico en términos del módulo elástico (G') y módulo dinámico (G''). Para realizar dichas determinaciones se utilizó un reómetro con una configuración de cono – plato y plato – plato para la viscosidad y viscoelasticidad respectivamente.

Es importante señalar que la cepa parental ATCC 9046 se utilizó como control en cada una de las etapas de este proyecto, con fines de comparación.

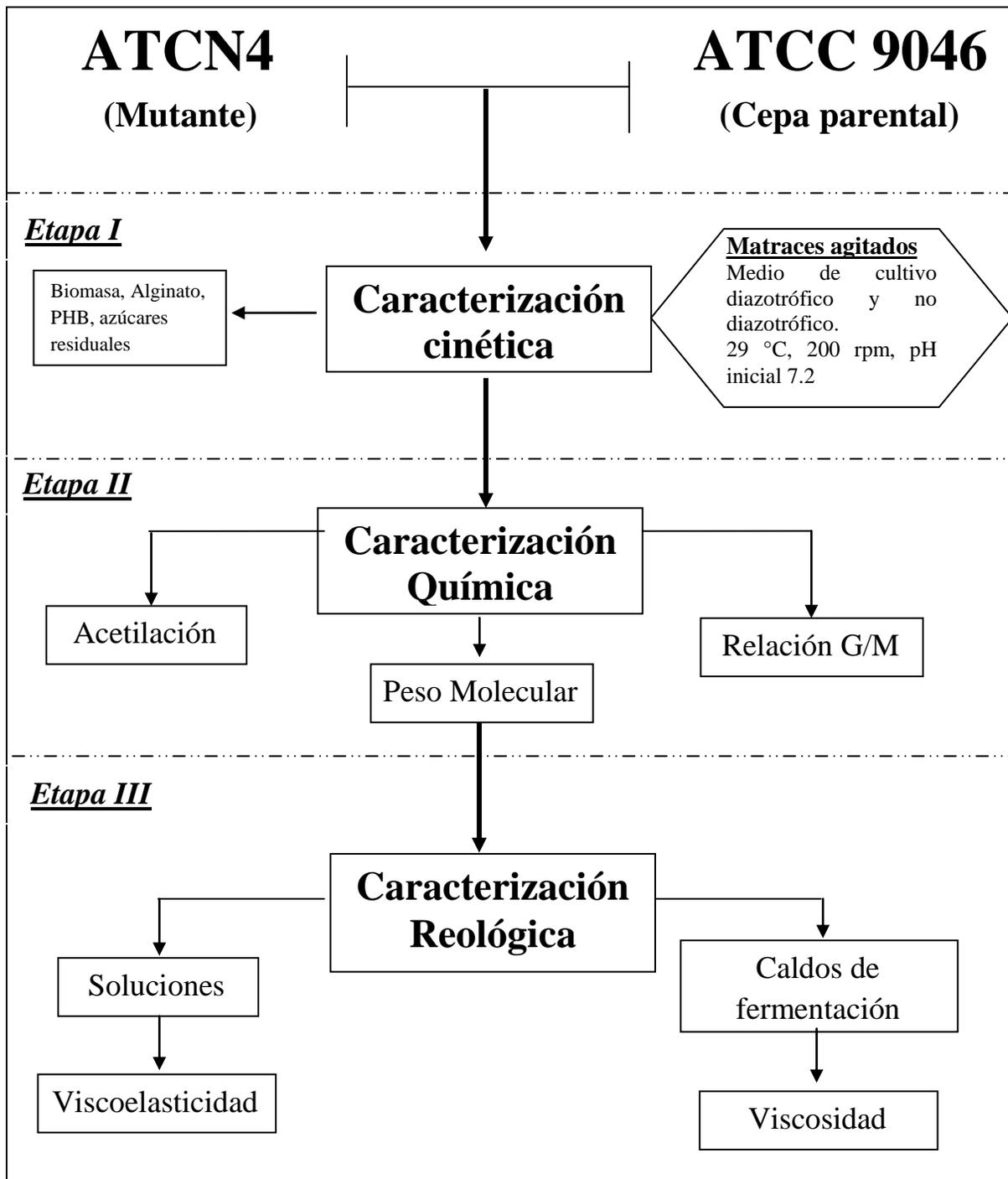


Figura 7.1. Estrategia experimental del proyecto.

8.3 Métodos analíticos

8.3.1 Determinación de biomasa por gravimetría

La determinación de biomasa se llevó a cabo usando un método gravimétrico de peso seco ya descrito por Peña *et al* (1997). Se mezclaron 10 mL de caldo de cultivo con 1 mL de Na₂EDTA (0.1 M) y 1 mL de NaCl (1 M). Se centrifugó a 8 000 rpm durante 10 minutos. Se separó el sobrenadante y posteriormente el paquete celular fue filtrado con membranas Millipore de 0.45 μm de poro, previamente taradas. Las membranas se secaron a 70 °C por 24 horas en una estufa (Felisa), por diferencia de peso se determinó la concentración de la biomasa en g/L. Cada determinación se realizó por triplicado.

8.3.2 Determinación de biomasa por turbidimetría

Esta técnica es una manera rápida de determinar el crecimiento microbiano, para realizarlo se tomó una alícuota de 1 mL de caldo de cultivo y se hizo una dilución 1:50 con agua destilada. Se determinó la densidad óptica a una longitud de onda de 540 nm, en un espectrofotómetro Beckman modelo DU 650. Utilizando una curva patrón se correlacionó la densidad óptica con la concentración celular (g/L). Las figuras 8.1 y 8.2 muestran las curvas patrón para las cepas utilizadas en el desarrollo del proyecto.

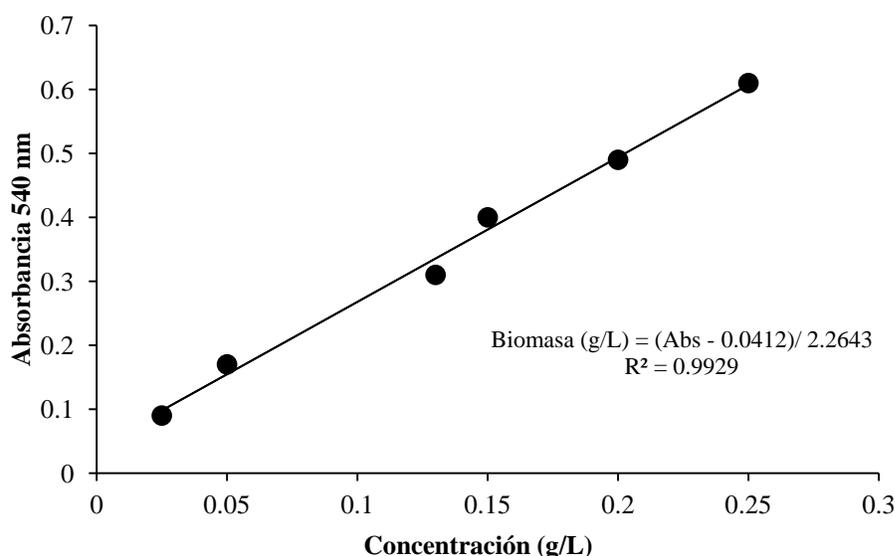


Figura 8.1. Curva patrón para la determinación de biomasa para la cepa ATCC 9046.

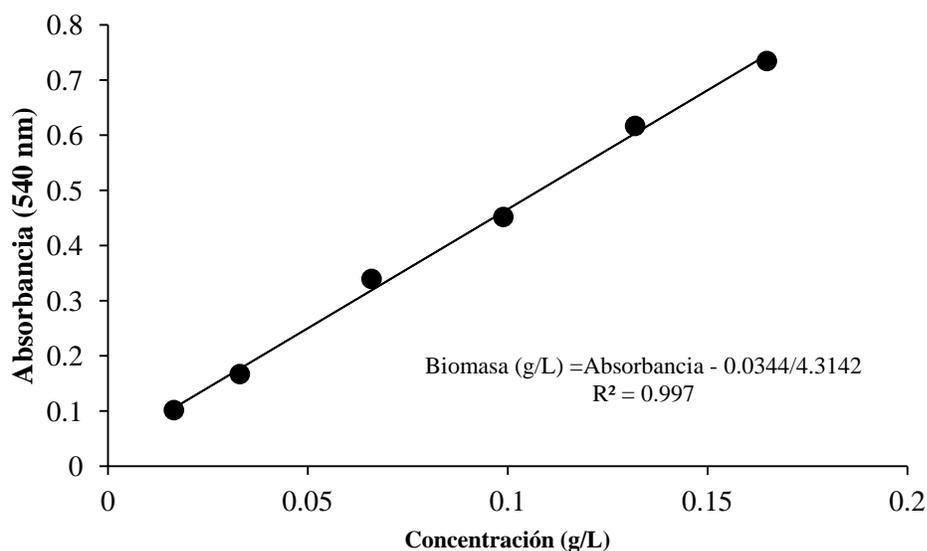


Figura 8.2. Curva patrón para la determinación de biomasa para la cepa ATCN4.

8.3.3 Determinación de proteína por el método de Lowry

El método de Lowry se basa en una reacción de unión del cobre a las proteínas bajo condiciones alcalinas, y en la reacción redox que ocurre entre los aminoácidos aromáticos y el ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico del Folin-Ciocalteu que se reduce para formar heteropolimolibdeno azul. La reacción resulta en un color azul fuerte detectable fácilmente por espectrofotometría (Lowry *et al*, 1951).

Se tomó una alícuota de medio de cultivo (1 mL) y se centrifugó a 12, 000 rpm por 10 minutos, se separó el sobrenadante y las células se lavaron con 1 mL de una solución de NaCl (0.85 %). Se tomaron 200 μ L de esta mezcla y se llevaron a 1 000 μ L con H₂O. Se añadieron 5 mL de solución reactiva: Na₂CO₃ (2 %) en NaOH (0.1 N), Tartrato de Na y K (2 %) y CuSO₄ (1 %). Se dejó reposar por 10 minutos y a continuación se añadieron 0.5 mL de reactivo de Folin (diluido con 1 volumen de agua). Se reposó por 30 minutos. La absorbancia fue leída a 625 nm (Lowry *et al*, 1951). Al mismo tiempo se corrió una curva de calibración (por triplicado) usando una solución patrón (2 mg/mL) de albúmina (figura 8.3).

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, se diluyó 1:20 con agua destilada, 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. Posteriormente se adicionó 1.0 ml de la solución DNS a cada muestra. Los tubos se calentaron a ebullición durante 5 minutos, 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 por triplicado utilizando soluciones de sacarosa en concentraciones de 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/ml (figura 8.4).

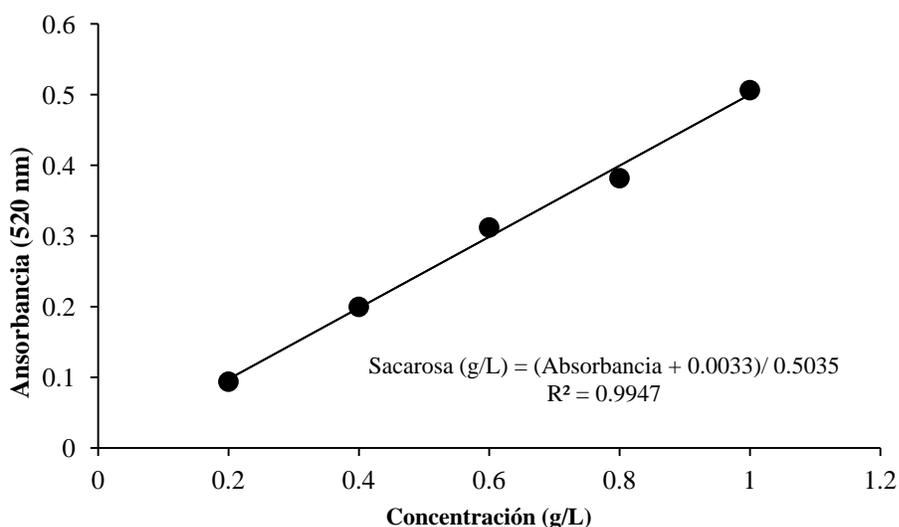


Figura 8.4. Curva patrón para la determinación de sacarosa.

8.3.6 Determinación del peso molecular por HPLC

El peso molecular promedio se determinó por cromatografía de filtración en gel (CFG), utilizando una serie de columnas Ultrahidrogel (UG 500, Waters) de 7.8 mm (diámetro interno) por 300 mm, acopladas a un equipo de HPLC (Waters, 2996) 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 en un programa de PC compatible (Empower, Waters). La calibración de las columnas se realizó utilizando pululanos de *Aerobasidium pullulans* como estándares de peso

molecular con un rango de 5 800 a 78 800 Da. La muestra de alginato fue filtrada a través de una membrana Millipore de 0.22 μm y una muestra de 100 μL se inyectó al sistema HPLC.

8.3.7 Determinación de la relación G/M

La determinación de ácido M se realizó con un método espectrofotométrico (Haug y Larsen, 1962). Se hidrolizaron 5 mg de alginato con 1 mL de H_2SO_4 (2N) a 121 $^\circ\text{C}$ por 30 minutos. Posteriormente, fueron neutralizados con 2.5 mL de CaCO_3 (1N). La mezcla se centrifugó a 3 500 rpm por 20 min. Del sobrenadante se separó 1 mL y se añadieron 6 mL de H_2SO_4 concentrado. La mezcla se dejó enfriar para posteriormente calentar a 55 $^\circ\text{C}$ durante 20 minutos. Finalmente, se añadieron 0.2 mL de la solución de carbazol (1% p/v en etanol), se dejó reposar durante 3 horas y se leyó la absorbancia a 530 nm que corresponde al ácido M presente. La concentración del ácido M fue calculada con la respectiva curva patrón elaborada por triplicado (figura 8.5).

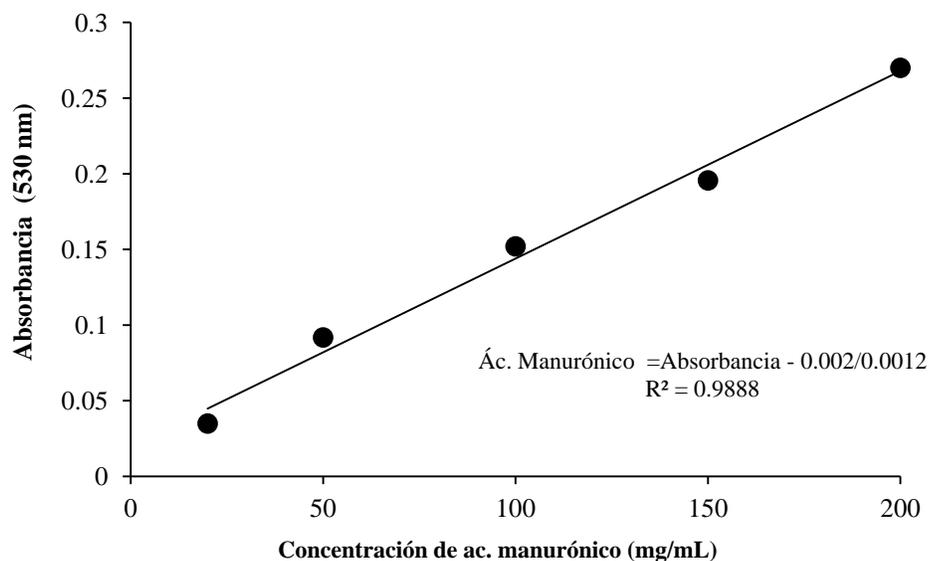


Figura 8.5. Curva patrón para la determinación de ácido manurónico

A la concentración del alginato microbiano se le restó el valor obtenido de ácido M, con lo que se obtiene la concentración de ácido G, el cociente es la relación G/M.

de 30 minutos y las muestras fueron inyectadas por duplicado. La señal del detector se procesó con un programa PC compatible (Empower, Waters). Se realizó una curva patrón por triplicado, utilizando ácido crotonico como estándar (figura 8.8).

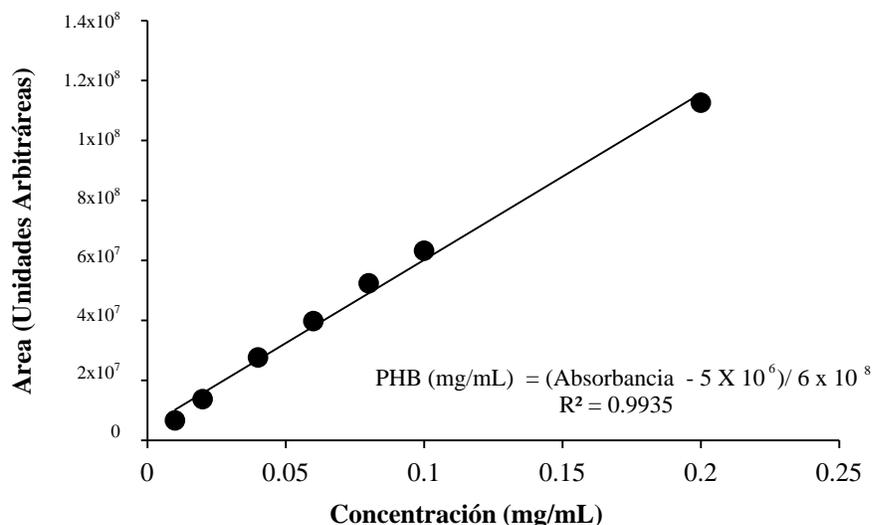


Figura 8.8. Curva patrón para la determinación de ácido crotonico.

8.3.11 Determinación de la viscosidad aparente

Para realizar las determinaciones de los parámetros reológicos del caldo de cultivo, se utilizó un reómetro de cono y plato marca TA Instruments-Waters LLC modelo Advanced Rheometer 1000 (AR 1000) a 25°C. Se trabajó con un gradiente de deformación de entre 0.5 a 1500 s⁻¹ (Mejía, 2008). Los datos obtenidos se ajustaron al modelo de la ley de la potencia para obtener el índice de consistencia y el índice de flujo:

$$\tau = K * \dot{\gamma}^n$$

Siendo:

τ = esfuerzo de corte (Pa)

K = índice de consistencia (Pasⁿ)

$\dot{\gamma}$ = velocidad de corte (s⁻¹).

9. RESULTADOS

Capítulo I

9.1 Caracterización cinética

La cepa ATCN4 posee una mutación en el gen *nqrE* (*nqrE::Tn5*) el cual codifica para una subunidad de la NADH: Ubiquinona oxidoreductasa translocadora de sodio (Na^+ -NQR). Este complejo es una bomba que acopla la oxidación exergónica del NADH con la ubiquinona al transporte de iones sodio del espacio citoplásmico al espacio extracelular, contribuyendo a la generación de un potencial transmembranal de sodio. Durante cultivos sólidos la mutante ATCN4 produjo ~ 4 veces más alginato respecto a la cepa silvestre (800 μg alg/ mg de proteína para la silvestre vs 3400 μg alg/ mg de proteína), sugiriendo que en *A. vinelandii* la falta en la actividad de la enzima Na^+ -NQR, causa la ausencia de un gradiente transmembranal de sodio e incrementa la producción de alginato (Núñez *et al*, 2009). A la fecha, la cepa mutante ATCN4 no ha sido evaluada en cultivos líquidos, por lo que se propuso una primera etapa de caracterización en términos del crecimiento celular, producción de alginato, acumulación de PHB y consumo de fuente de carbono.

Los resultados de las determinaciones se muestran en las figuras de los siguientes apartados, en donde se compara el desempeño de la cepa ATCN4 en relación al de la cepa silvestre ATCC 9046. Los puntos de las gráficas representan el promedio de tres cultivos independientes y las barras de desviación estándar reflejan la reproducibilidad de los datos.

9.1.1 Crecimiento celular

En diferentes estudios se ha encontrado que las mutaciones capaces de generar un incremento en la producción de alginato también provocan efectos negativos sobre el crecimiento celular, atribuyendo este fenómeno a un posible desvío de la fuente carbonada hacia la sobreproducción del polímero, en detrimento del crecimiento celular (Galindo *et al*, 2007). Tal es el caso de la cepa AT6, que posee una mutación (inserción) en el primer gen del operón *phbBAC*, que impidió por completo la síntesis de PHB y dio como resultado un aumento significativo en la producción de alginato en matraces agitados. Sin embargo, la mutación tuvo un efecto negativo sobre el crecimiento celular, presumiblemente por el costo energético impuesto por la producción de altas cantidades de alginato.

Por lo anterior, la estrategia inicial en esta etapa del proyecto consistió en promover el crecimiento celular de la mutante mediante el uso de una fuente nitrogenada. Para ello se seleccionó el extracto de levadura ya que de acuerdo a estudios previos realizados por Tinoco (1993), en donde se evaluaron fuentes de nitrógeno orgánicas (peptona, triptona) e inorgánicas (acetato de amonio, cloruro de amonio), cuando *A. vinelandii* se cultiva en presencia de extracto de levadura, no solo incrementa la síntesis de biomasa si no también mejora la producción de alginato (Reyes *et al*, 2003; Mejía, 2008).

Las cinéticas de los cultivos se corrieron a lo largo de 72 horas, tiempo reportado para que *A. vinelandii* se encuentre en la fase estacionaria. Los resultados de producción de biomasa de la cepa ATCN4 y de la cepa ATCC 9046 se presentan en la figura 9.1. Después de las primeras 24 horas de cultivo el crecimiento bacteriano de la mutante difiere al observado para la cepa silvestre, obteniéndose una velocidad específica de crecimiento (μ) de 0.1 h^{-1} y una concentración máxima de biomasa de 5.2 g/L en el caso de la mutante; mientras que la cepa control produjo 4.1 g/L de biomasa con un μ correspondiente a 0.094 h^{-1} .

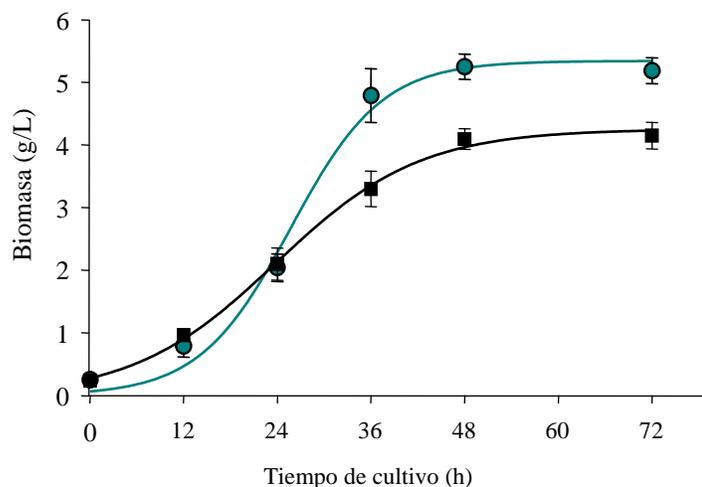


Figura 9.1. Cinética de crecimiento celular (en términos del peso seco) de la mutante ATCN4 (●) y cepa silvestre ATCC 9046 (■) cultivadas bajo condiciones no diazotróficas.

Resulta interesante el mayor crecimiento celular exhibido por la cepa ATCN4, este comportamiento difiere al de otras cepas mutantes de *A. vinelandii* previamente reportadas. Estas cepas tienden a sintetizar menores concentraciones de biomasa comparadas con la cepa silvestre, tal y como lo muestran los estudios de Miranda (1998), Segura *et al* (2003) y Mejía (2008), en donde se encontró que al cultivar a estas cepas bajo las mismas condiciones ambientales empleadas en este trabajo, las mutaciones (dirigidas a incrementar la producción de alginato) parecen afectar negativamente el

crecimiento celular (figura 9.2). En el mejor de los casos, se reportó que la cepa SML2 (que lleva una mutación la cual impide la depolimerización de alginato) logra un crecimiento celular similar al de la cepa silvestre (Trujillo-Roldán *et al.*, 2003).

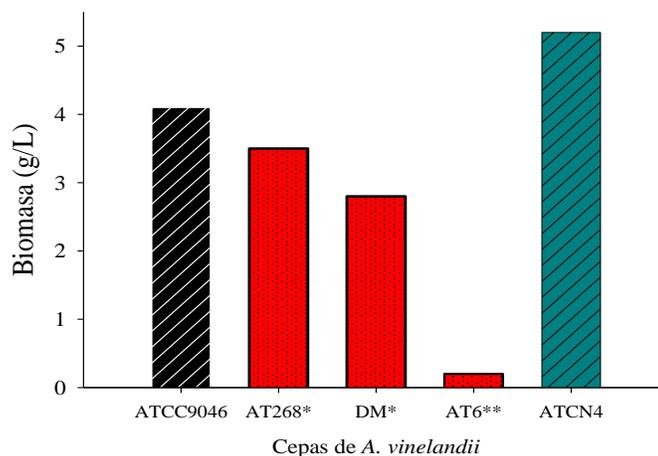


Figura 9.2. Concentración máxima de biomasa sintetizada por diferentes cepas mutantes de *A. vinelandii* cultivadas en matraces agitados y bajo condiciones no diazotróficas. *Galindo *et al.*, (2007); *Miranda (1998).

Por otro lado, observaciones al microscopio óptico muestran que las células de la cepa ATCC 9046 poseen una morfología bacilar, típica de las condiciones de cultivo no diazotróficas (figura 9.3a). En contraste, la mutante presentó morfología esférica (figura 9.3b), sugiriendo una mayor acumulación de gránulos de PHB. Debido a que el PHB se almacena de manera intracelular es común que la determinación de biomasa medida por peso seco (figura 9.1) incluya también a este polímero. Por lo tanto, los datos obtenidos para la determinación de crecimiento podrían ser un reflejo de la capacidad de acumulación del PHB, más que del crecimiento microbiano, sobreestimando así la producción de biomasa alcanzada por la cepa mutante. Con la finalidad de descartar esta posibilidad se cuantificó a la biomasa con base a la proteína presente (figura 9.4).

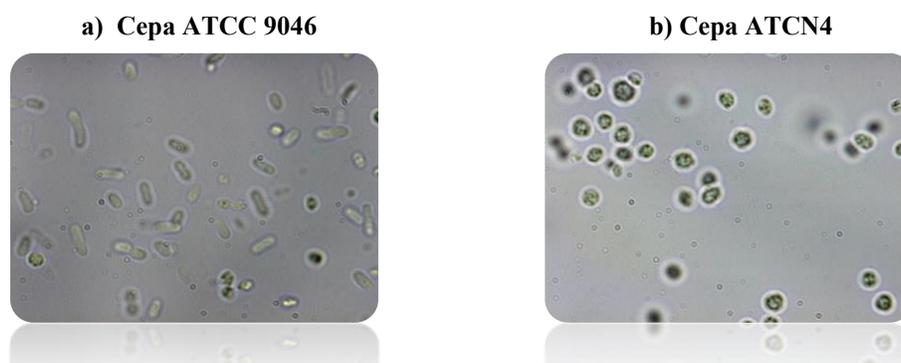


Figura 9.3. Fotografías al microscopio óptico (100 X), tomadas de cultivos no diazotróficos con 72 horas de fermentación: a) cepa silvestre ATCC 9046, b) cepa mutante ATCN4.

La cuantificación de proteína se presenta en la figura 9.4, se observó que después de las 36 horas de cultivo la mutante supera la producción de biomasa en relación con la cepa silvestre. Así, a las 72 horas de fermentación la mutante alcanzó 1.17 g/L, mientras que la cepa silvestre logra un valor de 0.8 g/L, confirmando el mayor crecimiento celular de la cepa ATCN4 observado en la determinación por peso seco.

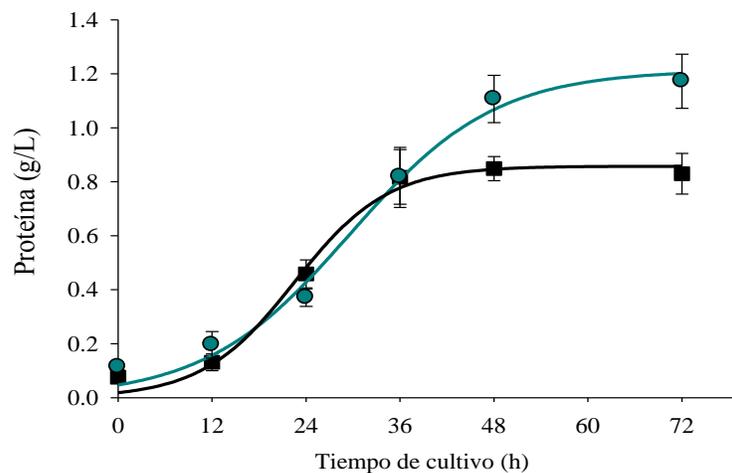


Figura 9.4. Cinética de crecimiento celular con base a proteína: cepa ATCN4 (●) y cepa ATCC 9046 (■) cultivadas bajo condiciones no diazotróficas.

Estudios previos con la cepa ATCN4 en donde se observó su potencial como sobreproductora de alginato, fueron realizados en ambiente diazotrófico. Es bajo esa condición que en cultivos sólidos se seleccionan mutantes con fenotipo mucoide (potenciales sobreproductoras de alginato). Tomando en cuenta lo anterior y debido a las diferencias fisiológicas que podría presentar la cepa mutante en ambas condiciones de cultivo, se llevó a cabo una evaluación en ambiente diazotrófico, eliminando el extracto de levadura del medio.

En la figura 9.5 se muestran los resultados de crecimiento con base a peso seco para los cultivos diazotróficos. Se aprecia que después de las 24 horas la mutante alcanzó una concentración de biomasa correspondiente a 1.16 g/L con una μ de 0.057 h^{-1} . Por su parte, la cepa ATCC 9046 logró sintetizar 1.94 g/L con una μ de 0.08 h^{-1} . En este caso, la mutante cultivada bajo condiciones diazotróficas acumuló 40 % menos biomasa que el control (cepa ATCC 9046). No obstante, al igual que en las condiciones no diazotróficas cabe la posibilidad de que la acumulación de PHB haga que se sobreestime el crecimiento microbiano, por lo que se cuantificó el contenido de proteína.

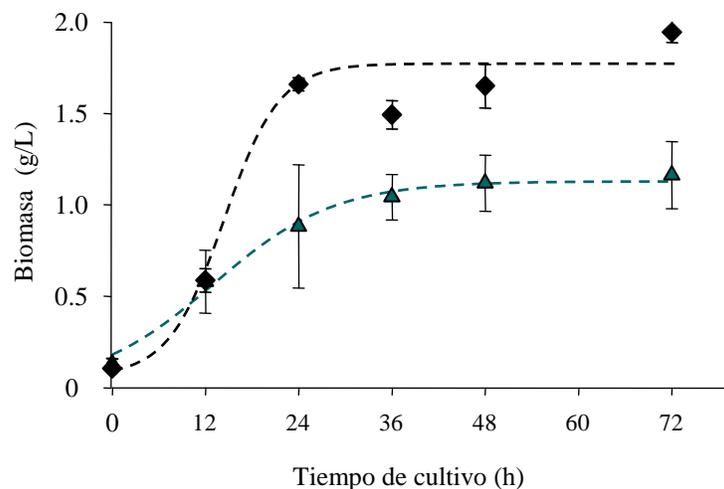


Figura 9.5. Cinética de crecimiento celular con base a peso seco: cepa ATCN4 (▲) y cepa ATCC 9046 (◆) cultivadas bajo condiciones diazotróficas.

De modo similar, se determinó el crecimiento cuantificando la cantidad de proteína para evitar las posibles interferencias ocasionadas por la acumulación de PHB. En la figura 9.6 se muestra el efecto de las condiciones diazotróficas sobre la producción de proteína. Se aprecia claramente cómo se invierten las tendencias en la síntesis de biomasa en comparación a las determinadas con base a peso seco (figura 9.5). Es decir, que la cepa mutante produce niveles superiores de proteína, alcanzando a partir de las 36 h, alrededor de 1.5 veces más proteína en comparación a la cepa ATCC 9046. Una mayor acumulación de PHB o la presencia de algún otro metabolito de reserva como el glucógeno, explicaría las diferencias entre los resultados de peso seco y proteína.

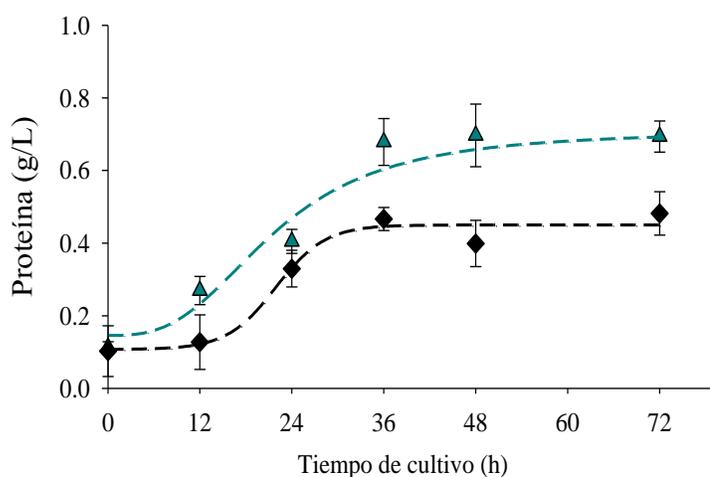


Figura 9.6. Cinética de crecimiento celular con base proteína: mutante ATCN4 (▲) y cepa silvestre ATCC 9046 (◆) cultivadas bajo condiciones diazotróficas.

9.1.2 Acumulación de PHB

Durante las observaciones al microscopio mencionadas previamente (figura 9.3), la mutante ATCN4 mostró una morfología que se caracteriza por la acumulación de PHB, un polímero de reserva sintetizado en condiciones de desequilibrio nutricional, usualmente cuando ocurren limitaciones de una fuente de nitrógeno, fósforo o magnesio en presencia de un exceso de la fuente de carbono y energía. Otro papel propuesto para el PHB es el de reservorio de poder reductor. Cuando en la célula se presenta una condición de baja concentración de oxígeno y existe un exceso de la fuente de carbono, se favorece la acumulación de NADH y NADPH. Como se sabe, la cepa ATCN4 tiene bloqueado el funcionamiento de la bomba Na^+ -NQR, misma que participa en la cadena respiratoria de *A. vinelandii* al acoplar la oxidación del NADH a la translocación de Na^+ (Häse y Barquera, 2001). Como consecuencia de la mutación, la cepa ATCN4 podría estar acumulando poder reductor y por ende sintetizando mayores niveles de PHB, respecto a la cepa silvestre. Por lo anterior, se decidió cuantificar los niveles de este polímero intracelular (Figura 9.8).

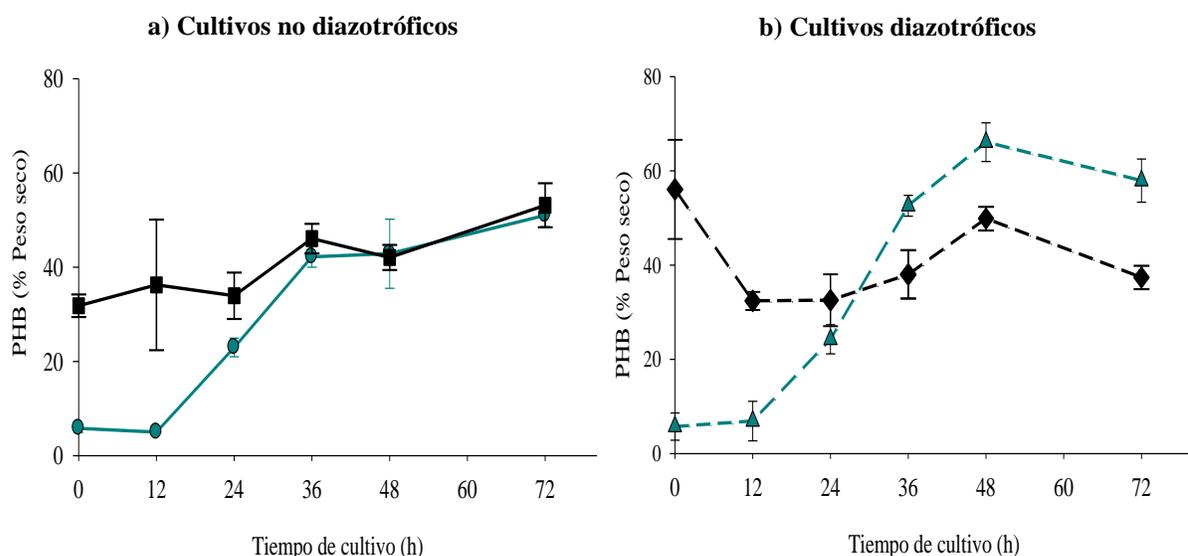


Figura 9.8. Cinética de producción de PHB. a) Condiciones de cultivo no diazotróficas: mutante ATCN4 (●) y cepa silvestre ATCC 9046 (■). b) Condiciones de cultivo diazotróficas: mutante ATCN4 (▲) y cepa silvestre ATCC 9046 (◆).

La figura 9.8 muestra los cambios en el porcentaje de acumulación de PHB con base a peso seco para las dos condiciones de cultivo manejadas en este trabajo. En ambiente no diazotrófico (figura 9.8a) se aprecia que transcurridas 36 horas de fermentación las cepas ATCN4 y ATCC 9046 acumularon niveles similares de PHB, entre un 51 y 53 % aproximadamente. Antes de este tiempo se

observó una diferencia importante, marcada principalmente por el comportamiento de la cepa ATCN4 que tuvo un notable incremento en los niveles de este polímero, el cual coincide con la fase exponencial de crecimiento ocurrida entre las 12 y las 36 horas de la cinética. En lo que respecta a la cepa control, el contenido de PHB permaneció relativamente constante, sólo se incrementó alrededor de 15 % desde el inicio hasta las 36 horas de cultivo.

De modo similar se evaluaron los cultivos diazotróficos (figura 9.8b), en donde la acumulación máxima de PHB de la cepa ATCN4 (66 %) resultó ser mayor respecto a la observada para la cepa silvestre (49 %). Se determinó que al igual que en los cultivos con extracto de levadura, el incremento en la acumulación de PHB de la cepa ATCN4 coincide con la fase exponencial de crecimiento bacteriano (de 12 a 24 horas). Sin embargo, en este caso la síntesis del polímero continúa hasta el inicio de la fase estacionaria (24 a 48 horas). Por otro lado, a lo largo de la fermentación, no se observó una variación considerable en la acumulación de PHB correspondiente a la cepa silvestre. En general se encontró que en cualquiera de las condiciones de cultivo, la cepa mutante incrementa el contenido de PHB, en cambio, en la cepa silvestre este polímero permanece relativamente constante.

9.1.3 Biosíntesis de alginato

Uno de los principales factores que motivó los estudios de la cepa ATCN4 en cultivos líquidos fue el fenotipo mucoide observado en medio sólido (Núñez *et al.*, 2009). Los resultados de la producción de alginato en cultivos sumergidos para la cepa ATCN4 y su respectivo control se muestran en la figura 9.9. Se aprecia que en ambiente no diazotrófico (figura 9.9a), ambas cepas sintetizan concentraciones de alginato similares. Únicamente al final de la fermentación (72 horas) la mutante produce ~ 14 % más polímero en relación a la cepa silvestre (4.3 g/L). De forma similar, el análisis de los cultivos diazotróficos (figura 9.9b) reveló que esta condición permite a la mutante sintetizar mayores concentraciones de alginato (35 – 38 %) en relación a la cepa silvestre.

La comparación de ambas condiciones ambientales permite distinguir que en ambiente no diazotrófico se producen las concentraciones más altas de alginato. De este modo, las cepas silvestre y mutante sintetizan 1.8 y 1.5 veces más alginato, respectivamente. Adicionalmente, se examinó de manera detallada la eficiencia en la producción de alginato, mediante el cálculo de los distintos rendimientos por unidad celular, denotados por $Y_{Alg/X}$ (figura 9.10).

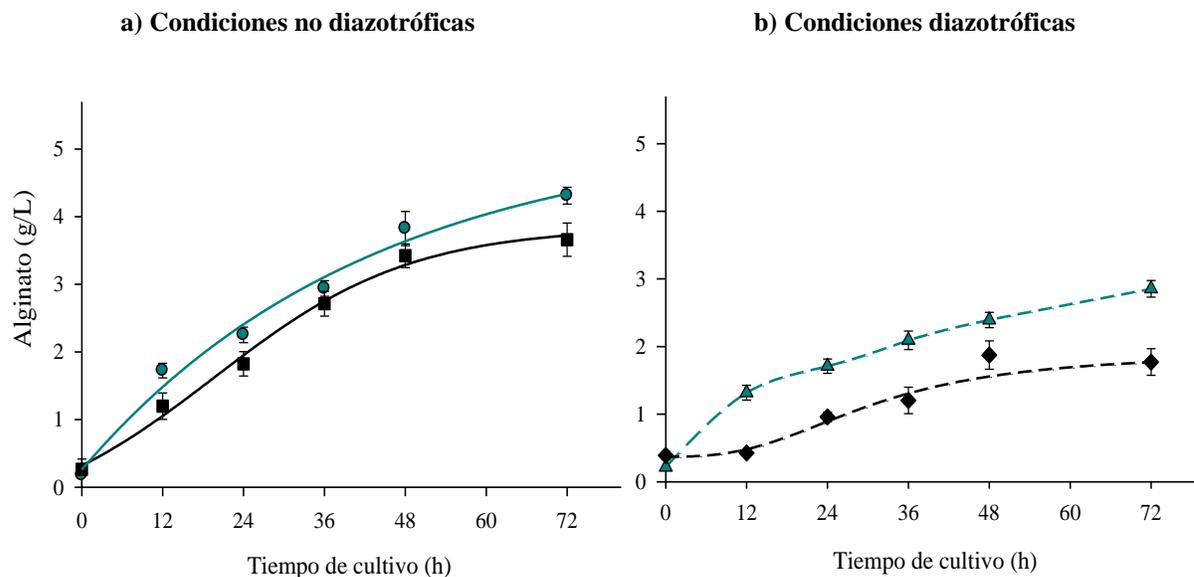


Figura 9.9. Cinética de producción de alginato. a) Condiciones no diazotróficas: mutante ATCN4 (●) y cepa silvestre ATCC 9046 (■). b) Condiciones diazotróficas: mutante ATCN4 (▲) y cepa silvestre ATCC 9046 (◆).

En la figura 9.10a, se aprecia que en ambiente no diazotrófico, la mutante ATCN4 no superó los rendimientos de alginato calculados para la cepa ATCC 9046, lo que coincide con investigaciones previas (Peña *et al*, 2002; Galindo *et al*, 2007) en las que se ha encontrado que diferentes cepas mutantes consideradas como sobreproductoras de alginato (en cultivos sólidos y ambiente diazotrófico) no son tan eficientes una vez que se cultivan en medio líquido (matraces) y bajo condiciones de cultivo no diazotróficas. Esto podría ser consecuencia del cambio ambiental, ya que en cultivos no diazotróficos se adiciona extracto de levadura al medio de cultivo. Al incluir la fuente nitrogenada, la disposición de aminoácidos en el medio permitiría que la bacteria no se encontrara limitada y canalizara su metabolismo hacia el crecimiento celular más que a la producción de alginato.

Contrario a los resultados de cultivos no diazotróficos, bajo condiciones diazotróficas se promueve un incremento de ~ 1.6 veces el rendimiento por unidad celular por parte de la cepa mutante (figura 9.10b). Aún así, estos datos no superan los reportados para cultivos sólidos, correspondientes a ~ 4 veces más alginato que la cepa silvestre (Núñez *et al*, 2009). Lo anterior, podría ser una respuesta a las diferencias en la transferencia de nutrientes y difusión de oxígeno entre cultivos sólidos y sumergidos. Resulta interesante la similitud en los rendimientos observados para la cepa ATCC 9046 y ATCN4 de cultivos no diazotróficos y diazotróficos respectivamente, debido a que para términos de aplicación, los cultivos con la cepa mutante ahorrarían el costo de la fuente de nitrógeno, que es 5 veces más costosa que la fuente de carbono (Sigma-Aldrich®, 2012).

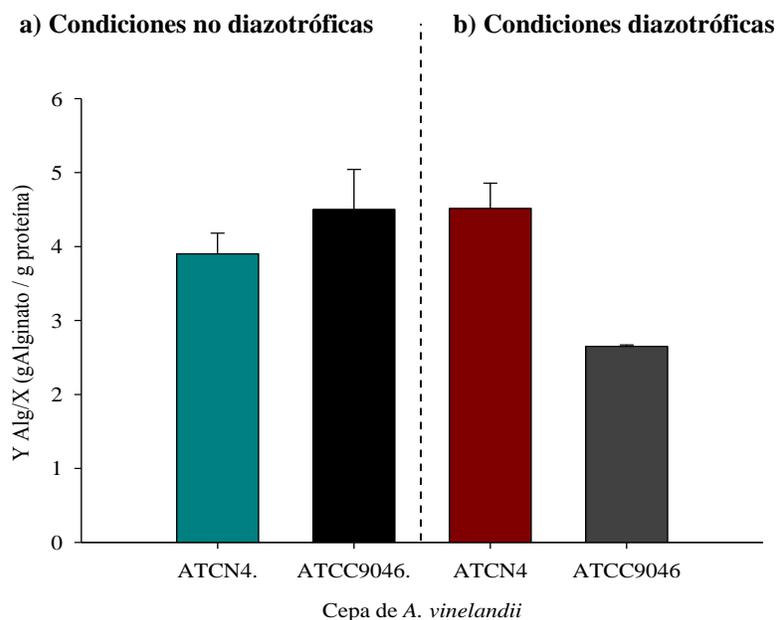


Figura 9.10. Rendimientos por unidad celular de las cepas ATCN4 y ATCC 9046 cultivadas bajo condiciones de cultivo diazotróficas y no diazotróficas.

En la tabla 9.1 se muestran las constantes α (asociada al crecimiento) y β (no asociada al crecimiento) de la ecuación de Luedeking-Piret. Se encontró que en todos los casos la producción de alginato es parcialmente asociada al crecimiento, por lo que $\beta \neq 0$. Es decir que el polímero se sintetiza tanto en la fase exponencial como en fase estacionaria. En esta misma tabla se presentan los porcentajes de alginato sintetizado durante fase estacionaria en función de las condiciones de cultivo. Se observó que independientemente de la cepa, bajo condiciones no diazotróficas se sintetiza ~ 25 % del alginato total. Por otro lado, en ambiente diazotrófico, alrededor de un 50 % de alginato es producido una vez que las bacterias se encuentran en la fase estacionaria. Estos resultados son congruentes con estudios previos realizados por Horan *et al*, (1981), Brivonese y Sutherland (1989), Tinoco (1993), Peña *et al* (1997), Peña *et al* (2002) y Reyes *et al* (2003), quienes trabajaron con diferentes cepas de *A. vinelandii* cultivadas en medio líquido, determinando que para estos casos, la síntesis del polímero también se encuentra parcialmente asociada al crecimiento. Al respecto, Sutherland (1977) y Horan *et al* (1983) sugirieron que el aumento en la producción de alginato en fase estacionaria podría estar relacionado con la disponibilidad de intermediarios para la síntesis de alginato como la GDP manosa y lípidos isoprenoides, los cuales también son utilizados en la síntesis de peptidoglicanos y lipopolisacáridos para la formación de la pared celular durante el crecimiento.

Tabla 9.1. Constantes de Luedeking Piret y porcentaje de alginato sintetizado en cada etapa de crecimiento celular.

| Cepa | Condición de cultivo | α (galg/g _{biom}) | β (galg/g _{biom} h) | % Alginato F. Estacionaria |
|-----------|----------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------|
| ATCN4 | No diazotrófica | 1.15 + 0.3 | 0.0059 ± 0.001 | 26 ± 3.22 |
| ATCC 9046 | | 1.12 ± 0.5 | 0.006 ± 0.001 | 25 ± 2.05 |
| ATCN4 | Diazotrófica | 1.08 ± 0.12 | 0.02 ± 0.003 | 50 ± 4.6 |
| ATCC 9046 | | 0.32 ± 0.06 | 0.008 ± 0.002 | 46 ± 3.05 |

De manera global los resultados en la producción de alginato por la mutante demuestran que las condiciones diazotróficas favorecen su producción por unidad celular, consiguiendo sintetizar niveles similares a los de la cepa silvestre (cultivada en presencia de extracto de levadura). Estos resultados indican que en diazotrofia, la falta en la actividad de la enzima Na⁺-NQR favorece la síntesis del alginato.

9.1.4 Consumo de sacarosa

La energía para los procesos de crecimiento, síntesis de macromoléculas y sus correspondientes monómeros proviene principalmente de la oxidación de la fuente de carbono. Una vez que la fuente carbonada es consumida por la bacteria, se cataboliza para producir poder reductor, esqueletos carbonados (intermediarios) y CO₂. Una porción de los equivalentes de reducción son oxidados por los componentes de la cadena respiratoria, resultando en la síntesis de ATP, mientras que otra fracción de este poder reductor, se utiliza para convertir los intermediarios en polímeros y biomasa durante las reacciones redox.

La vía Entner-Doudoroff es la principal ruta para la degradación de la glucosa en *A. vinelandii*. Esta vía posee la característica de tener un bajo rendimiento energético, produce solo una molécula de ATP por molécula de glucosa. De acuerdo a los estudios realizados por Horan *et al* (1981) y Mejía *et al* (2010), la bacteria es capaz de utilizar una amplia variedad de sustratos carbonados como glucosa, fructosa, manitol, glicerol, sorbitol y sacarosa. Sin embargo, esta última promueve un mayor crecimiento celular y producción de alginato, por lo que se seleccionó como fuente de carbono y energía para este trabajo.

La cinética de consumo de sacarosa bajo condiciones no diazotróficas y diazotróficas se muestra en la figura 9.11. En general ninguna de las cepas a cualquiera de las condiciones de cultivo

agotó por completo la fuente de carbono. Hay que enfatizar que el crecimiento celular entró en la fase estacionaria después de las 36 y 24 horas para las condiciones de cultivo no diazotrófico y diazotrófico, respectivamente, por lo se propone que la sacarosa no es el sustrato limitante para el crecimiento celular de las cepas ATCN4 y ATCC 9046. En otro sentido, la producción no asociada al crecimiento, junto con la presencia de fuente de carbono en el medio de cultivo durante la fase estacionaria, sugiere la posibilidad de sintetizar el polímero después de la fase exponencial de crecimiento.

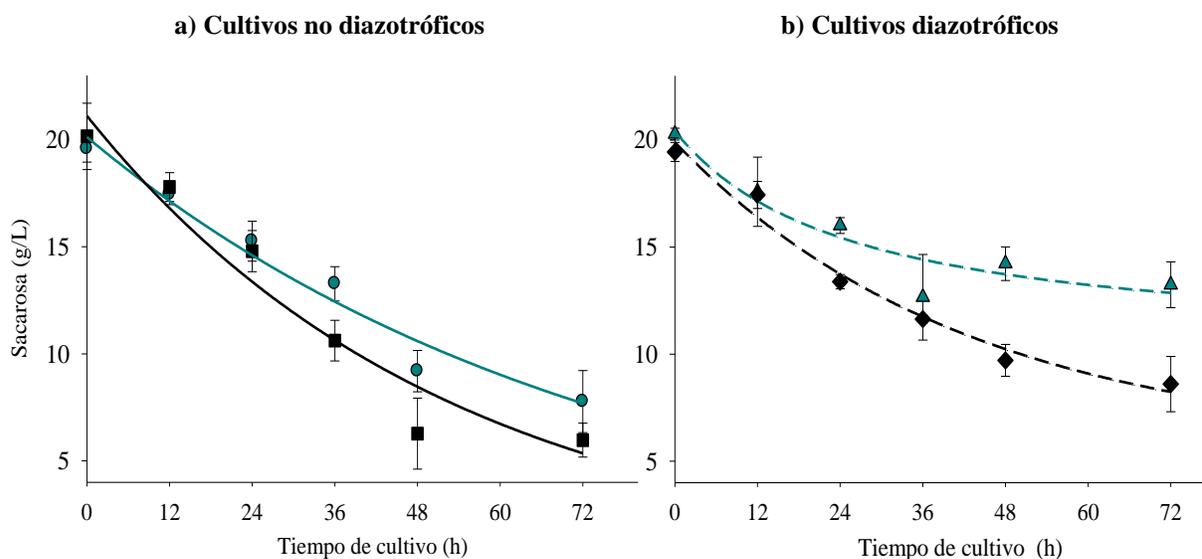


Figura 9.11. Consumo de sacarosa. a) Condiciones no diazotróficas: mutante ATCN4 (●), cepa silvestre ATCC 9046 (■). b) Condiciones diazotróficas: mutante ATCN4 (▲), cepa silvestre ATCC 9046 (◆).

Como se observa en la figura 9.11 la mutación tuvo efectos importantes sobre el de consumo de la fuente de carbono en las 2 condiciones de crecimiento evaluadas. Se determinó que bajo condiciones no diazotróficas (figura 9.11a), la cepa ATCN4 incorporó a su metabolismo el 60 % (11.9 g/L) de la sacarosa a una velocidad de 0.12 g sac/g cel•h; la cepa silvestre agotó el 73 % (14.6 g/L) con una velocidad de consumo de 0.2 g sac/g cel•h. Por otra parte, en cultivos diazotróficos (figura 9.11b) la mutante se comportó de manera singular, debido a que metabolizó únicamente el 30 % de la fuente de carbono a una velocidad de consumo de 0.38 g sac/g cel•h. En cuanto a la cepa silvestre, oxidó el 59 % (10.8 g/L) de la sacarosa suministrada al medio a una velocidad de consumo de 0.48 g sac/g cel•h.

La presencia o ausencia de extracto de levadura afectó claramente el metabolismo de la cepa ATCN4. Por lo anterior, se decidió analizar la distribución de la sacarosa en los principales productos

generados. Los cuales se expresan como los rendimientos de alginato ($Y_{Alg/S}$), PHB ($Y_{PHB/S}$), biomasa ($Y_{X/S}$) y rendimiento global, es decir, el equivalente a la suma de los rendimientos previos (figura 9.12).

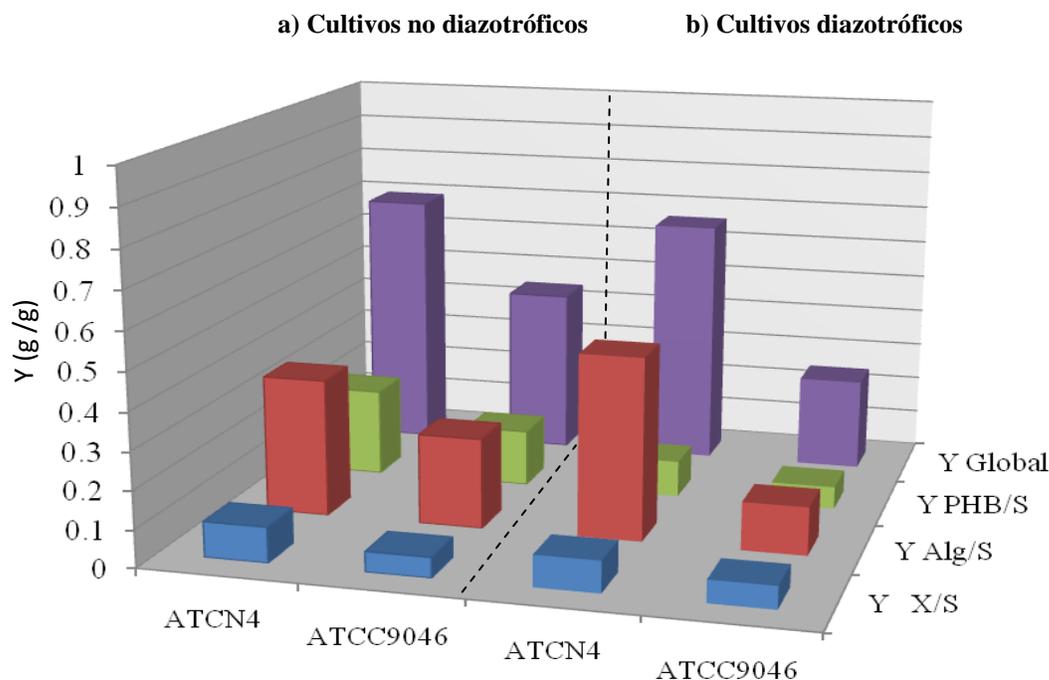


Figura 9.12. Rendimientos con base a sacarosa en la fase exponencial de crecimiento de la mutante ATCN4 y la cepa ATCC 9046 cultivadas bajo condiciones diazotróficas y no diazotróficas. Y_{Global} (■) $Y_{PHB/S}$ (■); $Y_{Alg/S}$ (■); $Y_{X/S}$ (■).

A pesar de que bajo condiciones no diazotróficas no existieron diferencias marcadas en la sacarosa consumida (figura 9.11a), el flujo de la fuente carbonada hacia uno u otro producto metabólico si es distinto entre las dos cepas (figura 9.12a). Comenzando con el hecho de que el rendimiento global ($Y_{Global/S}$) de la mutante superó 1.6 veces el de la cepa silvestre. Esto implica que los rendimientos de $Y_{PHB/S}$ y $Y_{Alg/S}$ sean 1.5 veces más altos, mientras que $Y_{X/S}$ resultó 1.8 veces superior al de la cepa ATCC 9046. Para las condiciones diazotróficas, la figura 9.12b muestra que la mutación incrementó 2.7 veces los rendimientos globales con base a sacarosa, 1.6 veces los $Y_{PHB/S}$, 3.8 veces los $Y_{Alg/S}$ y 1.4 veces los $Y_{X/S}$. Los resultados anteriores evidencian cambios generados en los flujos de carbono como resultado de la mutación la cepa ATCN4.

Los cultivos con la cepa mutante ATCN4 bajo ambas condiciones de cultivo presentaron un efecto positivo en metabolismo celular, ya que además de desviar preferencialmente el flujo de carbono

hacia la síntesis de alginato, se obtuvieron rendimientos superiores de biomasa y PHB en comparación a los de la cepa silvestre. Esto sugiere que la mutación en el complejo Na^+ -NQR podría estar relacionada con el uso eficiente de la fuente carbonada en *A. vinelandii*.

Capítulo II

9.2 Caracterización química

La producción industrial de alginatos bacterianos no ha sido posible debido a las bajas concentraciones volumétricas alcanzadas hasta ahora. Mejía *et al* (2010) obtuvieron una concentración final de 10 g/L, la cual, a pesar de ser la más alta reportada en la literatura, no es suficiente para competir con la obtenida de fuentes algales o incluso con otros polímeros microbianos como la xantana y el ácido poliglutámico, cuyas concentraciones máximas alcanzaron los 30 y 23 g/L, respectivamente (Richard y Margaritis, 2003). Sin embargo, se ha considerado que una sinergia entre la biología molecular y la bioingeniería, permitiría generar alginatos bacterianos de alta calidad, con propiedades mejoradas en relación a los algales. De esta manera se harían eventualmente competitivos en el mercado. Por lo anterior, en la segunda parte del proyecto se llevó a cabo la caracterización del grado de acetilación, peso molecular y relación G/M de los alginatos obtenidos en las diferentes condiciones evaluadas.

9.2.1 Grado de acetilación

Los cambios en las propiedades de los alginatos pueden resultar muy valiosos para algunas aplicaciones, sobre todo en el campo biomédico y biotecnológico. Esto convierte a la acetilación en una de las características más importantes de los alginatos bacterianos ya que su presencia en los residuos manurónicos, aún en pequeñas proporciones, origina alginatos con propiedades deseables (Skjak-Braek *et al*, 1989), como una mayor capacidad viscosificante y la posibilidad de formar geles suaves y flexibles. Sin duda, el poder controlar el grado de acetilación de los alginatos ayudaría a mejorar sus propiedades funcionales. Dada la importancia de esta propiedad química, se decidió cuantificarla en los polímeros sintetizados durante este trabajo, considerando que el proceso enzimático de acetilación podría verse afectado por algún cambio inherente a la mutación en ATCN4.

Como se puede observar en las figuras 9.13a y 9.13b, no existen modificaciones significativas en el grado de acetilación de los alginatos sintetizados en condiciones diazotróficas y no diazotróficas. Así, al final de los cultivos los alginatos presentan un contenido de acetilos ~ 12 %. Estos resultados contrastan con lo reportado previamente por Peña *et al* (1997) y Miranda (1998), quienes encontraron grados de acetilación de entre 1 y 3 % para esta misma cepa desarrollada en ambiente no diazotrófico.

La discrepancia de estos resultados podría deberse a las distintas sensibilidades de los métodos utilizados en cada caso.

Peña *et al* (1997) y Miranda (1998) emplearon un método colorimétrico, basado en una reacción entre el alginato acetilado con hidroxilamina en solución alcohólica (McComb y McCready, 1957). Dado que se trata de un método indirecto se ha considerado poco preciso, de tal forma que subestima los valores reales. Por otro lado, en este trabajo se empleó una técnica directa y sencilla que consiste en la ruptura del enlace *O*-acetilo del polisacárido y la posterior cuantificación de los acetilos liberados mediante cromatografía de intercambio iónico (Cheetham y Punruckyong, 1984).

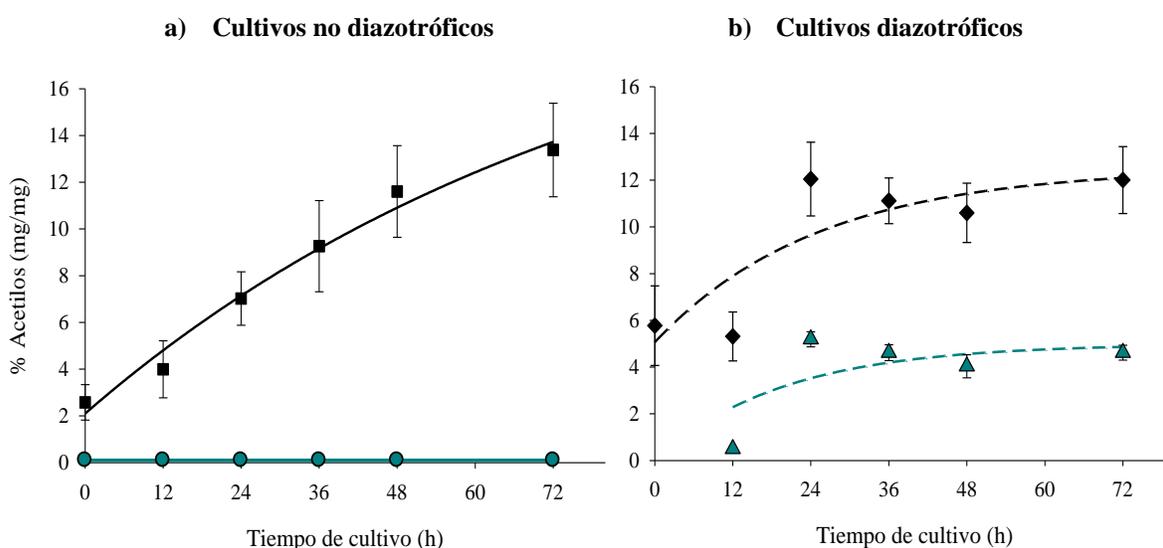


Figura 9.13. Evolución en el grado de acetilación del alginato. a) Condiciones no diazotróficas: mutante ATCN4 (●), cepa silvestre ATCC 9046 (■); b) Condiciones diazotróficas: mutante ATCN4 (▲), cepa silvestre ATCC 9046 (◆).

Para los alginatos producidos por la cepa ATCN4, se aprecia claramente que el proceso de acetilación se inhibe por completo en los cultivos no diazotróficos (figura 9.13a) o disminuye considerablemente (3 veces menos) respecto a la cepa silvestre en cultivos diazotróficos (figura 9.13b), alcanzado como máximo ~ 4 % de acetilación. Aún cuando se requiere más información al respecto, los datos sugieren que la ausencia de la actividad de Na^+ -NQR afecta negativamente la etapa de acetilación del polímero.

9.2.2 Peso molecular promedio del alginato

Entre las características químicas que influyen de manera notable en las propiedades de los alginatos se encuentra su peso molecular. Esta propiedad es particularmente importante en la viscosidad de los polímeros en solución, ya que una molécula de alto peso molecular tiende a adquirir un gran volumen hidrodinámico generando un notable incremento en la viscosidad (Cárdenas, 1997). En la figura 9.14 se presentan los datos de los pesos moleculares promedio (PMP) correspondientes a los alginatos evaluados. Se observó que en ambiente no diazotrófico la cepa mutante sintetizó alginatos con un peso molecular promedio similar al de la cepa silvestre (figura 9.14a) y que estos se incrementan gradualmente durante el transcurso de la fermentación, alcanzando valores máximos de aproximadamente 1500 kDa. Bajo condiciones diazotróficas la cepa mutante sintetizó polímeros de alrededor de 2300 kDa a las 36 horas de cultivo. Después de este tiempo se observó una notable disminución de los pesos moleculares promedio (figura 9.14b). Mientras tanto, el alginato obtenido por la cepa ATCC 9046 cultivada bajo estas mismas condiciones (figura 9.14b), presentó PMP prácticamente constantes después de las 24 horas de cultivo.

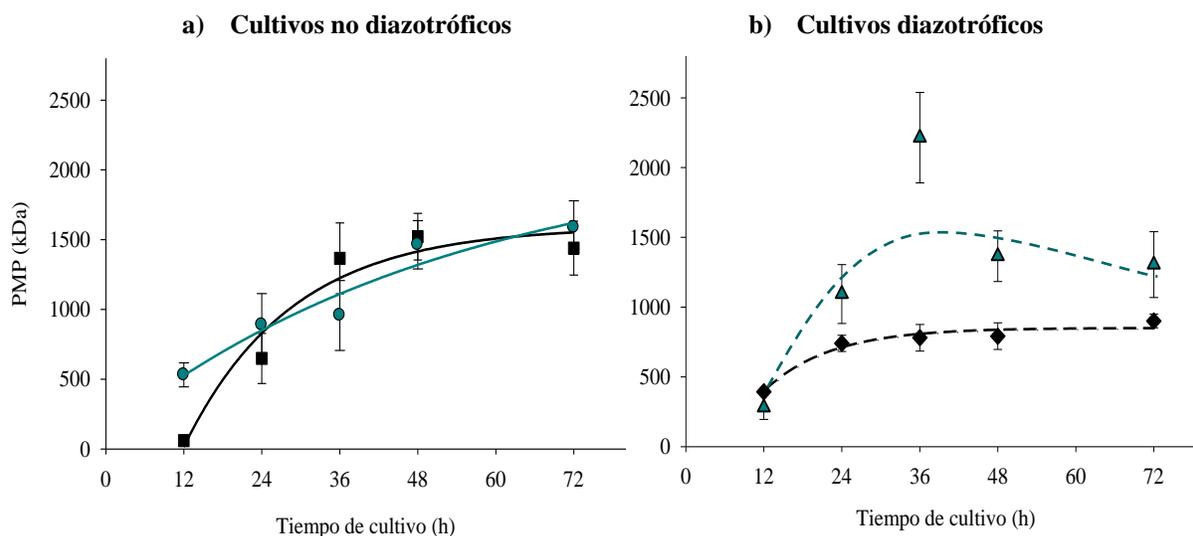


Figura 9.14. Evolución en el peso molecular promedio del alginato: a) Condiciones no diazotróficas: mutante ATCN4 (●), cepa silvestre ATCC 9046 (■); b) Condiciones diazotróficas: mutante ATCN4 (▲), cepa silvestre ATCC 9046 (◆).

Resulta relevante el notable incremento en el PMP de los alginatos aislados de cultivos diazotróficos con la cepa ATCN4 (~ 2300 kDa). Hasta ahora, este valor no solo supera los PMP calculados en este trabajo, sino que además es superior respecto a lo encontrado previamente para la

cepa silvestre (1500 a 1900 kDa) y otras cepas mutantes cultivadas en matraces (Galindo *et al*, 2007). Tal es el caso de las cepas mutantes AT6 (340 kDa), CN26 (1130 kDa), AT268 (1100 kDa), SML2 (1150 kDa) e incluso la DM (1700 kDa). Esta última, anteriormente reportada como una cepa capaz de sintetizar polímeros con los PMP más altos para en cultivos con matraces (Peña *et al*, 1997; Reyes *et al*, 2003, Segura *et al*, 2003; Trujillo-Roldán *et al*, 2003; Galindo *et al*, 2007).

9.2.3 Distribución del peso molecular del alginato

Se realizó el análisis de los perfiles de distribución de pesos moleculares (cromatogramas) del alginato producido a diferentes tiempos del cultivo, tanto en ambiente no diazotrófico como en diazotrófico. La distribución del peso molecular del alginato obtenido de las cepas mutante y silvestre bajo condiciones no diazotróficas fueron relativamente similares a partir de las 24 horas de cultivo (figura 9.15a y 9.15b), antes de este tiempo (12 h) se observa que el alginato de la mutante ATCN4 presentó un perfil de distribución más amplio respecto al de la cepa ATCC 9046. También, se aprecia que en cada una de las muestras existen distribuciones de una familia de pesos moleculares bien definida, señalada por la presencia de un solo pico en el cromatograma.

Se sabe que el desplazamiento de los cromatogramas hacia la izquierda indica la síntesis de alginatos de mayor peso molecular. Para este trabajo se observó que los alginatos la cepa ATCN4 (condiciones no diazotróficas) presentaron los PMP más altos entre las 48 y 72 horas (figura 9.15a). A partir de las 36 horas, la cepa ATCC 9046 comienza a sintetizar este tipo de alginatos de alto peso molecular (figura 9.15b). Los datos, son congruentes con lo previamente reportado para alginatos aislados de cultivos en matraz con la cepa silvestre de *A. vinelandii* en relación a los perfiles de distribución y el peso molecular promedio (Peña *et al*, 1997).

Por otro lado, se determinó que bajo condiciones diazotróficas no existen diferencias marcadas en las distribuciones de los PMP para la cepa ATCC 9046 (figura 9.15d), confirmando los PMP prácticamente constantes calculados para estos polímeros (figura 9.14b). De acuerdo a los resultados de la figura 9.14b, los alginatos de mayor PMP para las cepa ATCN4 cultivada bajo condiciones diazotróficas se calcularon a las 36 h de fermentación. Por lo que es congruente que el cromatograma correspondiente a esta muestra, presente el mayor desplazamiento hacia la izquierda (figura 9.15c). Posteriormente, entre las 48 y 72 horas de cultivo ocurre un desplazamiento del cromatograma hacia la derecha y una clara disminución de área bajo la curva, sugiriendo que una familia de alginatos de bajo

peso molecular (posible consecuencia de la despolimerización), se está “diluyendo” con los alginatos de mayor peso molecular (2300 kDa).

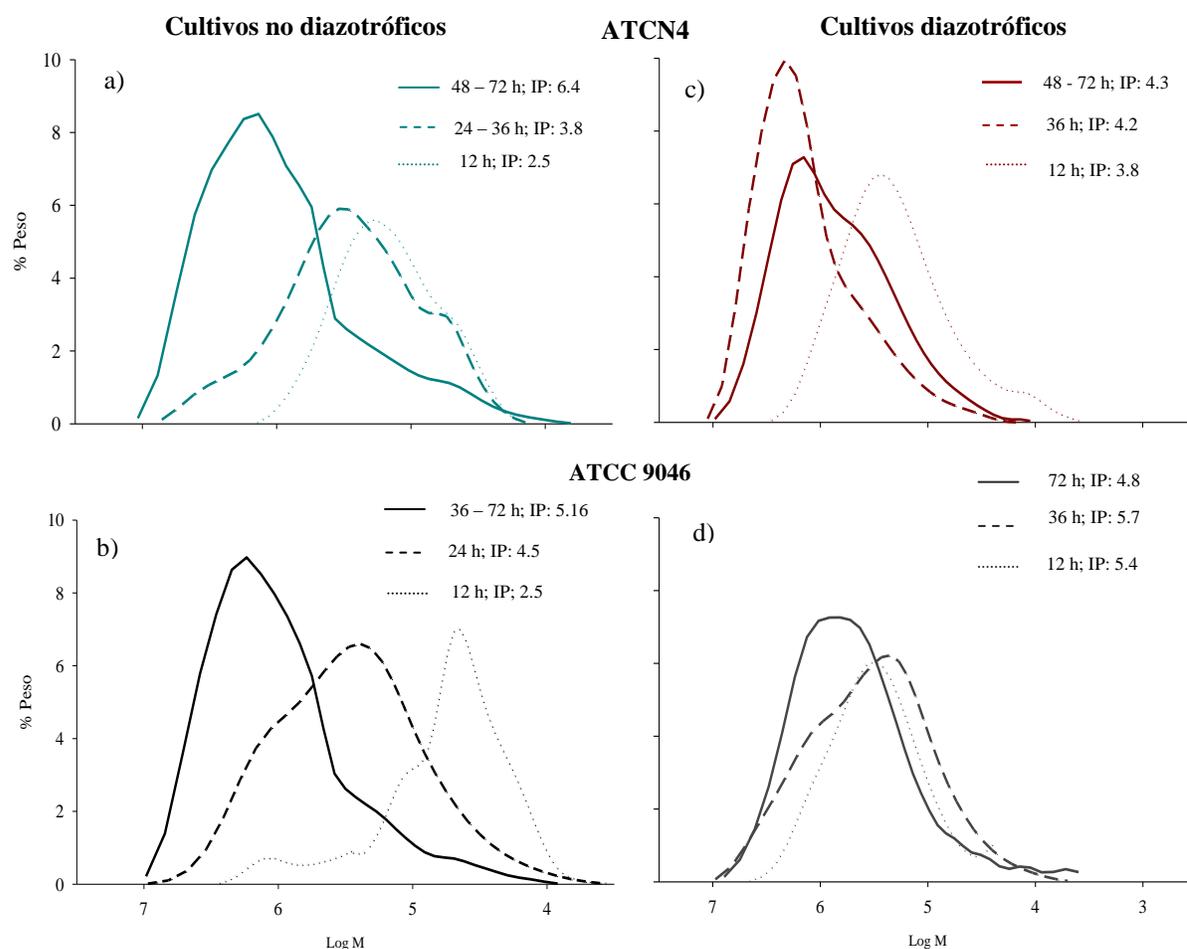


Figura 9.15. Distribución de peso molecular e índices de polidispersión del alginato sintetizado bajo condiciones diazotróficas y no diazotróficas por la mutante ATCN4 (a,c) y cepa silvestre ATCC 9046 (b,d) a diferentes tiempos de fermentación.

La polidispersión de un polímero es un reflejo de la distribución de los pesos moleculares que se encuentran en una determinada muestra. De acuerdo a Moe *et al* (1995) y Clementi *et al* (1998), existe una relación inversa entre el IP y el número de moléculas del mismo peso molecular presentes en una población. De esta forma, los IP más altos corresponden a poblaciones más heterogéneas. Se calcularon los diferentes índices de polidispersión, la tendencia general muestra un aumento en los IP conforme los cromatogramas se desplazan hacia la izquierda (figura 9.15). Esto indica que conforme aumenta la edad de los cultivos, las familias de pesos moleculares se vuelven más diversas, debido a que contienen alginatos con pesos moleculares de tiempos iniciales del cultivo.

Finalmente, se encontró que el análisis de los pesos moleculares y su distribución permitieron elucidar que bajo condiciones de cultivo no diazotróficas la mutación en ATCN4 no ejerce cambios notables en el proceso de polimerización del alginato. En cambio, en ambiente diazotrófico se tiene un impacto positivo al sintetizar polímeros de alto PMP. En este sentido y debido a que el alginato juega diferentes roles dependiendo de las condiciones ambientales, es posible que el alginato de alto peso molecular de la mutante ATCN4 se sintetice como respuesta a un probable aumento de la osmolaridad intracelular.

9.2.4 Relación Gulurónicos/Manurónicos (G/M)

Como se mencionó previamente en los antecedentes, el alginato está constituido por dos unidades estructurales, el ácido M y el ácido G. Considerando que el contenido relativo, secuencia y distribución de estos monómeros de alginato tiene un profundo impacto sobre sus propiedades fisicoquímicas. Uno de los principales problemas de los polímeros algales es la alta variación que presentan en su composición. Por ello se ha buscado un proceso de modificación enzimática que permita producir alginatos más homogéneos, sin embargo, hasta la fecha no existe algún producto en el mercado con esta peculiaridad (Draget *et al*, 2002). Alternativamente, los alginatos bacterianos poseen la ventaja de contar con un sistema de epimerización del alginato. Se trata de un conjunto de enzimas que se encargan de epimerizar el C-5 de algunos residuos manurónicos para convertirlos en ácido gulurónico, creando así diferentes patrones de epimerización, incluyendo ácido poligulurónico (Rehm y Valla, 1997; Draget *et al*, 2002; Galindo *et al*, 2007). A pesar de que existe muy poca información acerca de las epimerasas, diversos autores, entre ellos Skaj-Braek *et al* (1985) y Valla *et al* (2001), han planteado la hipótesis de que los grupos acetilo de la cadena de alginato funcionan como una barrera estérica que impide el funcionamiento de estas enzimas. Debido a lo anterior, resultó atractivo evaluar el contenido relativo de monómeros G y M de los alginatos provenientes de la cepa ATCN4, misma que al parecer tiene afectado el proceso de acetilación, los resultados se presentan en la figura 9.16.

Los alginatos generados bajo condiciones no diazotróficas con la cepa ATCC 9046 (figura 9.16a) mostraron una relación G/M prácticamente constante (~2.8). Por otra parte, los valores calculados para los polímeros de la cepa ATCN4 exhibieron un notable incremento a lo largo de la fermentación (de 1.3 a 4.3), llegando a ser superiores a los de la cepa silvestre después de 24 horas de cultivo (figura 9.16a). Contrariamente, bajo condiciones diazotróficas la relación G/M de los alginatos producidos por la cepa silvestre a lo largo de la fermentación, tiende a ser superior que la calculada

para los de cepa mutante (figura 9.16b). Así, al final del cultivo la cepa silvestre produce alginatos con una relación G/M ~ 2 veces mayor que los alginatos de la cepa mutante.

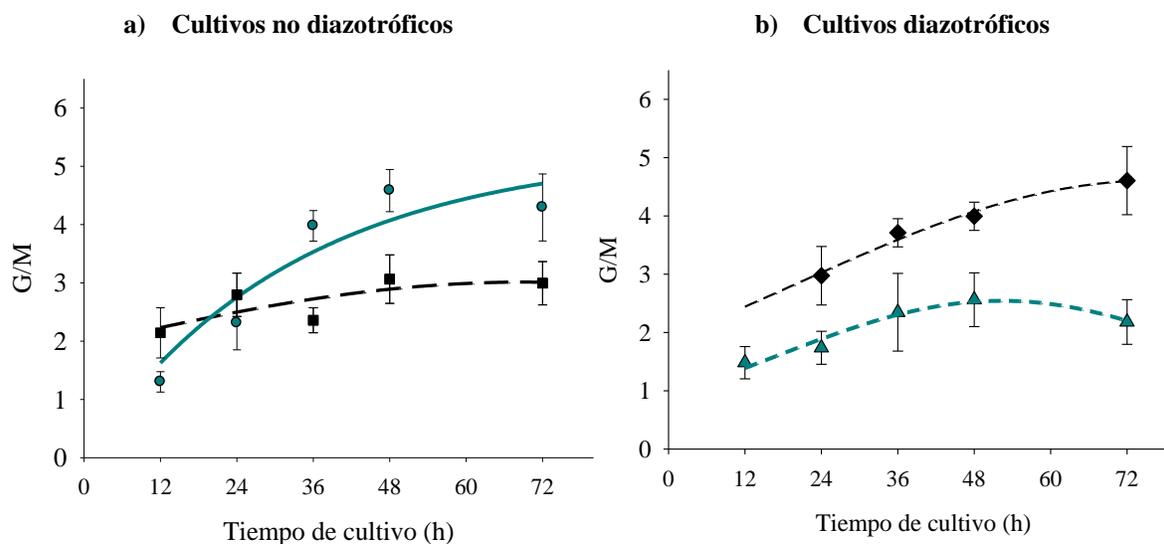


Figura 9.16. Evolución de la relación (G/M) del alginato. a) Condiciones no diazotróficas: mutante ATCN4 (●), cepa silvestre ATCC 9046 (■); b) Cultivos diazotróficos: mutante ATCN4 (▲), cepa silvestre ATCC 9046 (◆).

Al parecer, los resultados de la relación G/M obtenidos para ambas cepas, no son congruentes con la hipótesis de protección estérica que ejercen los grupos acetilo ante la actividad de las epimerasas. De ser así, los polímeros de la cepa ATCN4 serían mejores sustratos para las epimerasas que los sintetizados por la cepa silvestre. Sin embargo, es posible que las diferencias en la relación G/M reflejen distinta actividad en las epimerasas de cada cepa (Clementi, 1997), producto de los cambios impuestos por el ambiente y por la mutación.

Capítulo III

9.3 Caracterización reológica de caldos de fermentación y soluciones reconstituidas de alginato

Las aplicaciones industriales de los alginatos basadas en sus propiedades viscosificantes, gelificantes y estabilizantes representan los usos cuantitativamente más importantes de estos polímeros, por lo que conocer sus características reológicas es de gran interés, sobre todo si se trata de alginatos sintetizados por *A. vinelandii*, que hasta ahora han sido relativamente poco investigadas. Por ello, en una tercera etapa de este proyecto se evaluaron las propiedades reológicas de los alginatos, en términos del índice de flujo e índice de consistencia. Se investigaron también las propiedades mecánicas (módulo de almacenamiento o elástico y módulo de pérdida o viscoso) de soluciones (2 %) preparadas con los mismos polímeros.

9.3.1 Viscosidad de los caldos de fermentación

Los alginatos en solución se caracterizan por ser fluidos no Newtonianos del tipo pseudoplástico (Mancini *et al*, 1996; Clementi *et al*, 1998). Un fluido no Newtoniano es aquel que no tiene un valor de viscosidad definido y constante (Malkin e Isayev, 2006; Barnes, 2000), en estos casos la viscosidad se denomina viscosidad aparente (μ_{ap}) y depende del gradiente de deformación ($\dot{\gamma}$).

Las curvas de flujo son herramientas básicas en el análisis reológico de un fluido. Su forma permite identificar la naturaleza reológica del fluido o material, así como determinar la viscosidad y los parámetros fundamentales bajo diferentes condiciones de trabajo u operación (Barnes, 2000; Malkin e Isayev, 2006). La evolución de la viscosidad aparente en todas las muestras de los caldos de fermentación exhibió un comportamiento típico de un fluido no Newtoniano. Con el objeto de ilustrarlo se presentan las curvas de flujo de una muestra representativa obtenida de cultivos no diazotróficos con la cepa mutante ATCN4 (figura 9.17).

En la figura 9.17 se aprecia claramente que la μ_{ap} disminuye con el incremento del gradiente de deformación ($\dot{\gamma}$), confirmando que se trata de un fluido no Newtoniano. Las flechas en la figura 9.17 indican que el comportamiento no Newtoniano se vuelve más pronunciado conforme transcurre el tiempo de fermentación. Para analizar y comparar a detalle cada una de las muestras a diferentes tiempos de cultivo se calcularon parámetros reológicos como son el índice de consistencia (K) y el

índice de flujo (n) de acuerdo al modelo de la Ley de la potencia (ver detalles en Materiales y métodos).

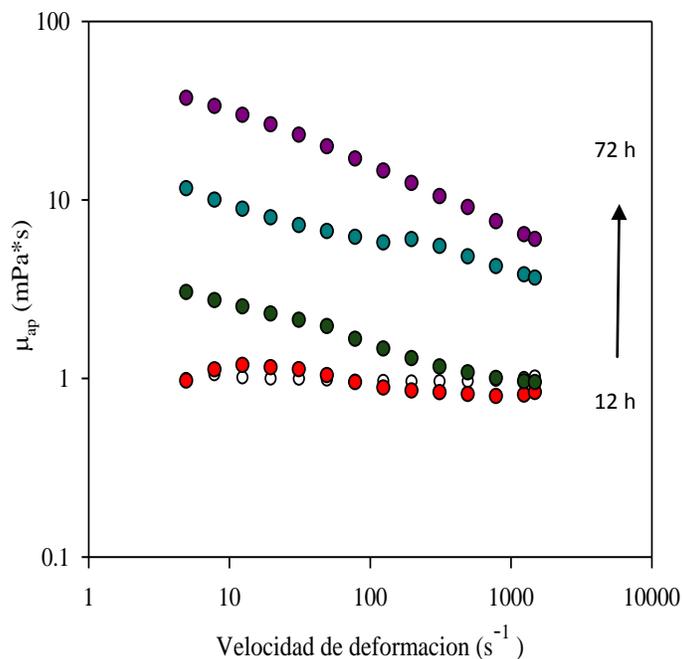


Figura 9.17. Reograma de viscosidad aparente de caldos de fermentación, obtenidos de cultivos no diazotróficos con la cepa ATCN4: 12 h (○), 24 h (●), 36 h (●), 48 h (●) y 72 h (●).

En el modelo de la Ley de la Potencia el índice de consistencia (K) está relacionado con la calidad reológica del alginato, en el entendido de que para este trabajo “*calidad reológica*” representa una mayor capacidad de los alginatos para conferir viscosidad a la solución en que se encuentra disuelto (en este caso el medio de cultivo). En cuanto al índice de flujo (n), indica la desviación del comportamiento del fluido evaluado con relación a un fluido Newtoniano, donde $n = 1$. Así, es posible obtener valores de $n < 1$ el cual determina la pseudoplasticidad. Entre menor sea este valor al de la unidad, el fluido tendrá un carácter más pseudoplástico. El comportamiento pseudoplástico es aquel en donde un aumento en la velocidad de corte provoca disminución de su viscosidad, independientemente del tiempo. Al cesar la deformación este tipo de fluidos recuperan su viscosidad inicial.

En la figura 9.18 se presenta la evolución de los parámetros reológicos K y n a lo largo de las fermentaciones bajo condiciones no diazotróficas y diazotróficas. Como se observa en la figura 9.18a, los alginatos sintetizados en cultivos no diazotróficos, no exhibieron diferencias en cuanto a pseudoplasticidad, alcanzando valores de $n \sim 0.6$ a tiempos finales de fermentación. Respecto al índice de consistencia, se aprecia que después de 36 horas los alginatos de la cepa silvestre confieren una

mayor calidad reológica en relación a los producidos por la cepa mutante ATCN4. Así, al final del cultivo (72 horas) los polímeros producidos por la cepa silvestre logran valores de $K = 117 \text{ mPa}\cdot\text{s}^n$, que representan 1.6 veces el índice de consistencia calculado para los de la cepa ATCN4 ($74 \text{ mPa}\cdot\text{s}^n$). En ambiente diazotrófico (figura 9.18b) se observa que independientemente de la cepa, esta condición de cultivo promueve la síntesis de alginatos con parámetros reológicos de mayor magnitud comparados con los cultivos no diazotróficos (figura 9.18a). Destaca el alginato sintetizado por la cepa ATCN4 (figura 9.16b), ya que presenta el mayor carácter pseudoplástico y la mejor calidad reológica, con valores de $n = 0.35$ y $K = 352 \text{ mPa}\cdot\text{s}^n$, al final del cultivo.

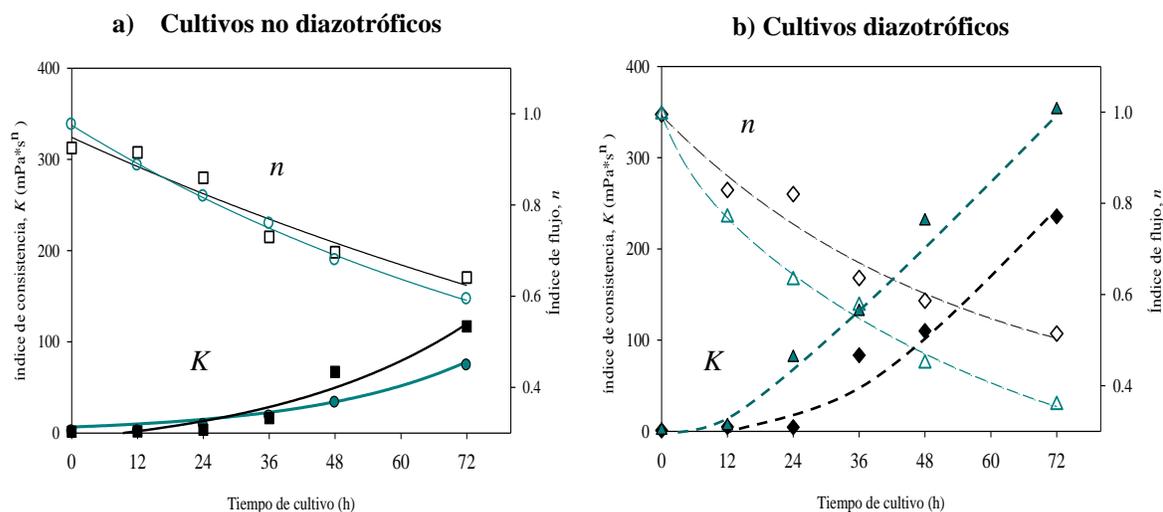


Figura 9.18. Evolución de los parámetros reológicos K y n de los caldos de fermentación a lo largo del cultivo: a) condiciones no diazotróficas: mutante ATCN4 (\bullet, \circ) y cepa ATCC 9046 (\blacksquare, \square); b) condiciones diazotróficas: mutante ATCN4 ($\blacktriangle, \triangle$) y cepa silvestre ATCC 9046 (\blacklozenge, \lozenge).

La figura 9.18 muestra la evolución de los parámetros reológicos a lo largo del cultivo, cabe mencionar que dichas propiedades dependen de factores como la concentración de alginato y las características químicas de la molécula. Con la finalidad de analizar la influencia de la concentración sobre las propiedades reológicas de los alginatos se presentan las figuras 9.19a y 9.19b. De manera global se observa que el incremento en la concentración del polímero promueve un comportamiento no Newtoniano del tipo pseudoplástico cada vez más pronunciado, indicado por la notable disminución de los índices de flujo para todos los alginatos evaluados. Por otro lado, también se aprecia un incremento en la calidad reológica de los polímeros (K), lo cual se traduce en una mayor viscosidad en solución.

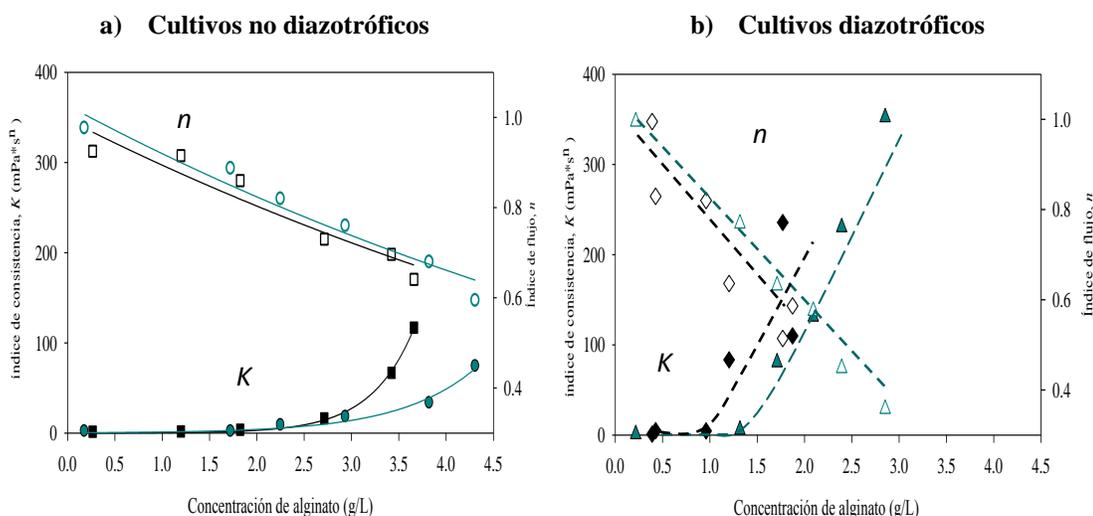


Figura 9.19. Influencia de la concentración de alginato sobre los parámetros reológicos K y n de los caldos de fermentación a lo largo del cultivo: a) Condiciones no diazotróficas: mutante ATCN4 (●, ○) y cepa ATCC 9046 (■, □); b) Condiciones diazotróficas: mutante ATCN4 (▲, △) y cepa silvestre ATCC 9046 (◆, ◇).

Adicionalmente, en la figura 9.19 se observa que independientemente de la cepa, se necesitan concentraciones superiores a 1 g/L de alginato producido en cultivos diazotróficos para observar incrementos significativos en el índice de consistencia (figura 9.19b). En cambio, para los alginatos de condiciones no diazotróficas se necesitan 3 g/L para aumentar la capacidad viscosificante (figura 9.19a). También resulta notable que una vez iniciado el incremento en los índices de consistencia e independientemente de las condiciones ambientales, los alginatos de la cepa ATCC 9046, confieren mayor calidad reológica para una misma concentración del polímero en relación a los de la mutante ATCN4. Por ejemplo, para una concentración de alginato de 3.5 g/L bajo condiciones no diazotróficas se obtienen índices de consistencia de 66 mPa*sⁿ con los alginatos de la cepa silvestre y de 30 mPa*sⁿ para los polímeros de la cepa mutante (9.19a). Estas diferencias confirman la influencia de otros factores sobre las propiedades de flujo, tales como la composición química (G/M), el grado de acetilación y peso molecular del alginato. Por ello se analizó en qué medida la capacidad viscosificante se ve influenciada por cada uno de estos factores (figura 9.20).

Las figuras 9.20 a, b, c y d muestran los índices de consistencia, PMP, % acetilos y relación G/M en función del tiempo de cultivo. Como ya se mencionó anteriormente en esta condición, el índice K incrementa a concentraciones superiores a los ~3 g/L, las cuales se alcanzan pasadas 36 h de cultivo. En la figura 9.20b se observa que después de los 36 h, los PMP de alginatos correspondientes a la cepa ATCC 9046 tienden a ser constantes (~ 1400 kDa). En cuanto a la acetilación, se alcanzan niveles de 9

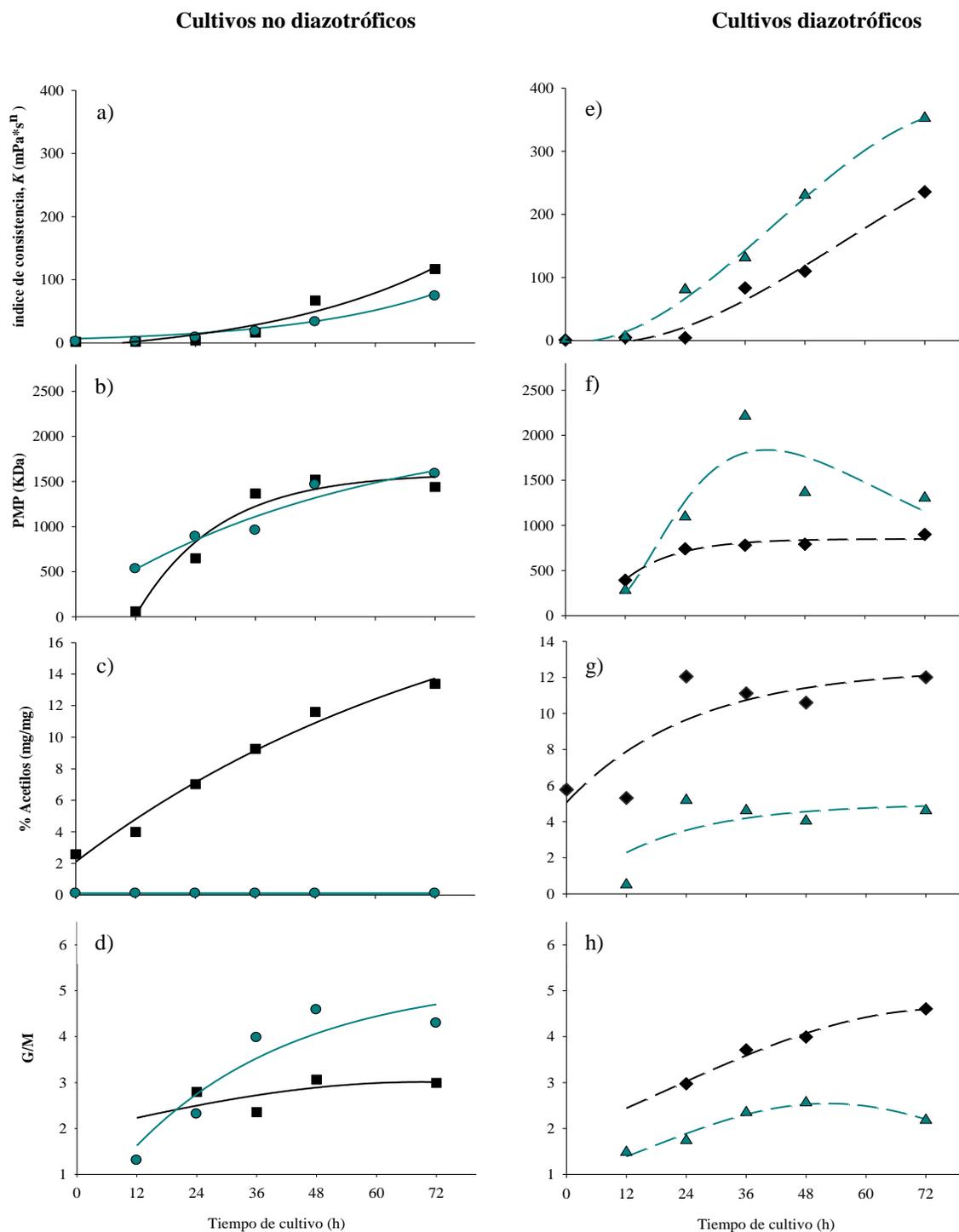


Figura 9.20. Parámetros reológicos de caldos de fermentación y propiedades químicas de las cepas mutante (●,▲) y silvestre (■,◆) polímero. Cultivos no diazotróficos: a) Índice de consistencia (K), b) PMP, c) % Acetilos, d) Relación G/M. Cultivos diazotróficos: e) Índice de consistencia (K), f) PMP, g) % Acetilos, h) Relación G/M.

9.3.2 Propiedades viscoelásticas de alginatos en solución

El principal objetivo de esta sección fue la generación de información básica acerca de la capacidad gelificante de los alginatos sintetizados por las cepas ATCN4 y ATCC 9046. Para ello se realizó un primer acercamiento mediante la evaluación del comportamiento viscoelástico de soluciones reconstituidas del polímero (2 %), las cuales se mezclaron con CaCl (0.7 M). Debido a que los alginatos gelifican instantáneamente se observó la formación de geles heterogéneos.

La figura 9.21 refleja la variación de los módulos dinámicos (G' y G'') a lo largo de un rango de frecuencia (0.1 y 100 rad/s) para muestras de alginato extraído a las 72 h de cultivo con las cepas ATCN4 y ATCC 9046. Recordemos que G' representa el carácter sólido de un material, en tanto que G'' se refiere al comportamiento como fluido (Draget *et al*, 1994; Cárdenas, 1997; LeRoux *et al*, 1999; Moresi *et al*, 2003). Para efectos prácticos los nombres de las muestras coinciden con el de la cepa de la que provienen. El comportamiento reológico general fue el típico de una solución macromolecular con $G'' > G'$ (Ferry, 1980). Debido a lo anterior, las muestras de alginato serán denominadas como soluciones. La comparación de las propiedades dinámicas en los extremos del rango de frecuencia (0.1 y 100 rad/s) hacen evidente una significativa dependencia de la frecuencia (Ferry, 1980; LeRoux *et al*, 1999).

Se determinaron diferentes zonas del espectro mecánico para las muestras *atcn4* y *atcc9046* de condiciones no diazotróficas (figura 9.21a). A bajas frecuencias (0 a 10 rad/s) se observó la zona viscosa terminal donde G'' predomina y el comportamiento fluido prevalece. Eventualmente, apareció la zona de transición, que es el punto de entrecruzamiento entre G' y G'' (Moresi *et al*, 2001). Para las muestras *atcn4* y *atcc9046* la transición ocurrió a los 10 y 22 rad/s, respectivamente. Posteriormente se presentó la zona de la meseta elástica (figura 9.21a) donde se generó un comportamiento tipo gel, el cual se caracteriza porque $G' > G''$ (Moresi *et al*, 2001). De acuerdo con lo reportado por Barnes (2000), las regiones del espectro mecánico para un sistema polimérico en particular, dependen de su concentración y peso molecular. En el caso de los geles *atcn4* y *atcc9046*, los resultados indican que no existen importantes diferencias entre los límites de cada una de las zonas del espectro, debido posiblemente la similitud en los pesos moleculares (1500 -1600 kDa) de los alginatos correspondientes.

Los resultados de las soluciones de alginatos sintetizados bajo condiciones diazotróficas se presentan en la figura 9.21b. La muestra *atcn4* que contiene alginatos de alto peso molecular (2300 kDa), presentó la zona viscosa terminal en un rango de frecuencias entre 0 y 10 rad/s, con $G'' > G'$. Posterior al punto de transición (10 rad/s) se observó el inicio de la meseta elástica. En cambio,

atcc9046, caracterizada como la solución de más bajo peso molecular de este ensayo (900 kDa), exhibió únicamente la zona viscosa terminal y el punto de transición se presentó al final del barrido de frecuencia (200 rad/s). Las diferencias en las zonas del espectro determinadas para cada tipo de solución son congruentes con lo reportado por Barnes (2000), quién indicó que en polímeros de alto peso molecular se generan zonas de meseta más pronunciadas y en algunas ocasiones los puntos de transición aparecen a frecuencias más bajas, tal y como ocurrió para la muestra *atcn4* (figura 9.21b).

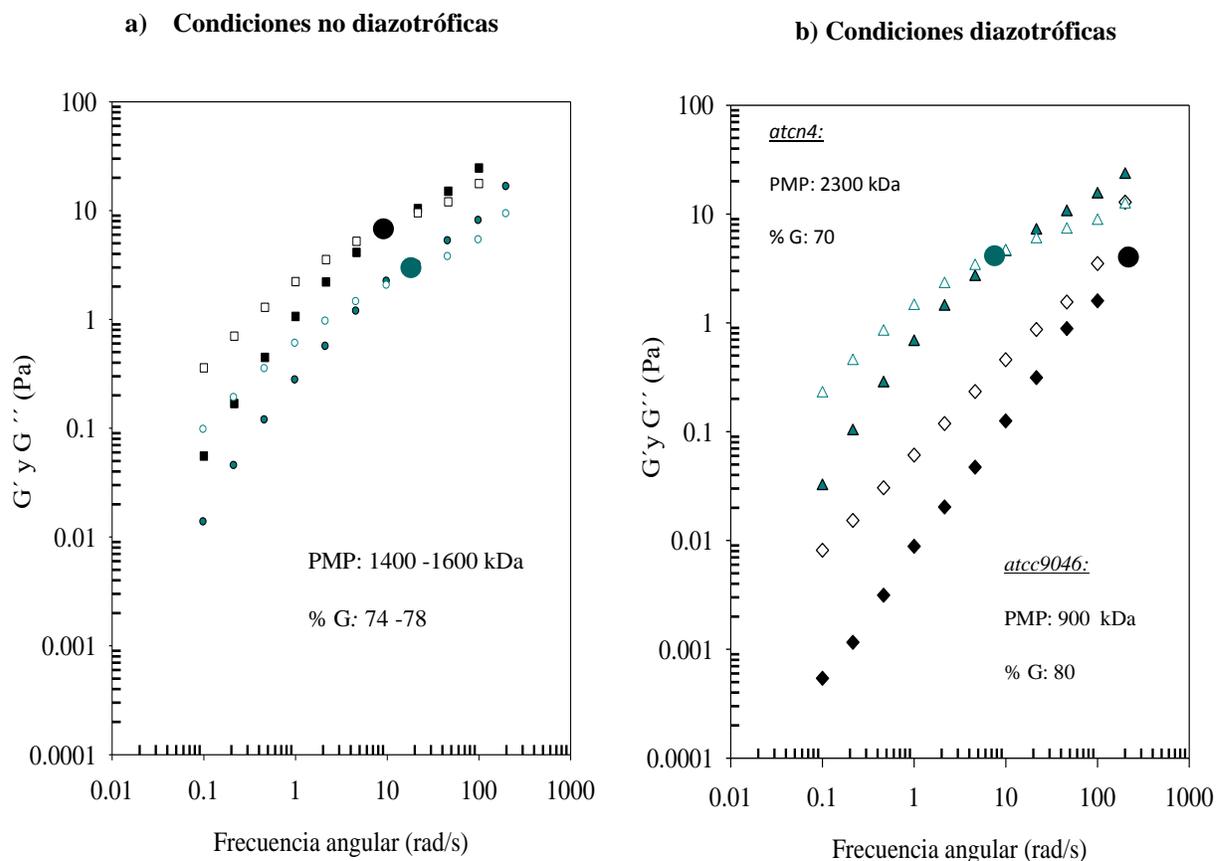


Figura 9.21. Espectros mecánicos, dependencia del módulo de almacenamiento (G') y módulo de pérdida (G'') sobre la frecuencia angular (ω) de soluciones de alginato (2%): a) condiciones no diazotróficas: muestra *atcn4*: G' (●), G'' (○); muestra *atcc9046*: G' (■), G'' (□). b) Condiciones diazotróficas; muestra *atcn4*: G' (▲), G'' (△), muestra *atcc9046*: G' (◆), G'' (◇).

Otro de los objetivos planteados para esta sección consistió en comparar las propiedades viscoelásticas de los alginatos con respecto a otros polímeros capaces de formar geles. Para ello se utilizó el módulo complejo (G^*) que representa la resistencia total a la deformación de un material

(Cárdenas, 1997; LeRoux *et al*, 1999). La recopilación de estos datos se muestra en la tabla 9.2. Se observa que la muestra *atcc9046* obtenida de ambiente diazotrófico, a pesar de ser la menos rígida de este ensayo (0.4 Pa), supera 2.5 veces la del alginato algal y 2 veces la fuerza de la F-actina, ésta última preparada a una concentración de 2 %. En el caso *atcn4* de cultivos diazotróficos, la fuerza es 17 y 14 veces la del alginato algal (Sigma Aldrich) y de la F-actina. Adicionalmente, se puede observar que las muestras de proteoglicano necesitan prepararse a una concentración de 3.7 % para lograr los valores de G^* similares a los de *atcn4* de cultivos no diazotróficos (3 Pa).

Las muestras *atcn4* de cultivos diazotróficos y *atcc9046* de cultivos no diazotróficos, son materiales relativamente rígidos: su valor de G^* supera 40, 30 y 2 veces los del alginato algal (Sigma Aldrich), F-actina y hialuronato respectivamente. Sin embargo, también son más débiles que el hialuronato, colágeno, fibrina y agar, aunque hay que considerar la importante diferencia en concentraciones para cada muestra.

Tabla 9.2. Comparación del módulo complejo (G^*) de distintos sistemas poliméricos.

| Polímero | Concentración (%) | G^* (Pa) ^a | Fuente |
|--------------------------------------|-------------------|-------------------------|------------------------------|
| Alginato algal (Sigma Aldrich) | 2 | 0.16 | Este trabajo |
| F-actina | 2 | 0.21 | Maruyama <i>et al</i> , 1974 |
| ATCC9046 (Cultivos diazotróficos) | 2 | 0.4 | Este trabajo |
| ATCN4 (Cultivos no diazotróficos) | 2 | 3 | Este trabajo |
| Proteoglicano | 3.7 | 3 | Zhu <i>et al</i> , 1996 |
| ATCN4 (Cultivos diazotróficos) | 2 | 6.4 | Este trabajo |
| ATCC9046 (Cultivos no diazotróficos) | 2 | 6.6 | Este trabajo |
| Hialuronato | 20 | 90 | Zhu <i>et al</i> , 1994 |
| Colágeno | 3.7 | 150 | Zhu <i>et al</i> , 1996 |
| Fibrina | 0.94 | 200 | Roberts <i>et al</i> , 1974 |
| Alginato algal | 2 | 2310 | LeRoux <i>et al</i> , 1999 |
| Agar | 2 | 40000 | Clark <i>et al</i> , 1983 |

^a Los resultados pertenecen a frecuencias angulares de 10 rad/s en todos los casos, excepto para la F-actina, donde $\omega = 2$ rad/s. No en todas las muestras corresponden a soluciones.

Un fenómeno interesante se observó al comparar los resultados de alginato que se determinaron en este trabajo con los obtenidos previamente por LeRoux *et al*, (1999). Como se muestra en la tabla 9.3, a pesar de que en ambos casos se utilizó la misma concentración de alginato (2 %), los últimos son, en el mejor de los casos, hasta 350 veces más fuertes. Este hecho puede ser debido a las diferencias en la estructura de la molécula de alginato, al método de gelificación o incluso a la sal utilizada en la formación de la red (Moresi *et al*, 2001; Moresi *et al*, 2004). La principal diferencia

radica en que las muestras analizadas por LeRoux *et al.*, (1999) son geles preparados por difusión en CaCl_2 (0.05 M) durante 1.5 h a temperatura ambiente, en tanto que los alginatos de este trabajo son soluciones al 2 % mezcladas con CaCl_2 (0.7 M) durante 10 minutos, a pesar de la formación de un gel heterogéneo, el análisis de viscoelasticidad determinó que las muestras se comportaron preferencialmente como soluciones.

Capítulo IV

9.4 Análisis tecnológico de los alginatos sintetizados por las cepas ATCC 9046 y ATCN4

En la tabla 9.3 se presentan las principales propiedades funcionales, características químicas y de producción de los alginatos sintetizados por las cepas ATCN4 y ATCC 9046 en las condiciones de cultivo planteadas para este trabajo. También, se muestran los mismos parámetros para algunos alginatos algales comerciales provenientes de *M. pyrifera*.

En términos de funcionalidad, se observa que en general los polímeros bacterianos superan por mucho la capacidad viscosificante y gelificante de los algales. En el mejor de los casos la calidad reológica de los alginatos producidos por la cepa ATCN4 es 39 veces superior, comparada los alginatos algales de bajo peso molecular. Los módulos complejos de alginatos algales pueden ser hasta 40 veces más bajos en relación a los de los polímeros bacterianos, sugiriendo que estos últimos forman soluciones más rígidas.

La tabla 9.3 también muestra los resultados de PMP e IP de para los alginatos algales y bacterianos. Es claro, que los PMP de los polímeros bacterianos son hasta 6 veces más altos respecto a los algales (alginato de la cepa ATCN4 a condiciones diazotróficas vs alginato algal de bajo peso molecular). En lo que respecta al IP de alginatos bacterianos se observan rangos amplios y más altos comparados con los algales. A pesar de esto, los polímeros bacterianos presentan la ventaja de tener un IP definido en función del tiempo de cultivo en que sea cosechado. Por otra parte, en términos de acetilación se confirmó que a pesar de no estar acetilados, los polímeros bacterianos pueden proporcionar mejores características funcionales en relación a los algales. En cuanto a la relación G/M, nuevamente se observan marcadas diferencias entre alginatos algales y bacterianos. Así, la relación G/M de estos últimos supera hasta 7 veces la de polímeros algales.

Respecto a los parámetros de producción, no existen diferencias significativas entre ambas cepas cultivadas en ambiente no diazotrófico (tabla 9.3). De manera opuesta, bajo condiciones diazotróficas la concentración y la producción específica de alginato de la mutante ATCN4 representan 1.6 veces las obtenidas por la cepa silvestre. Como ya se ha mencionado anteriormente, destaca el consumo de la fuente de carbono de la cepa mutante dado que metaboliza 35 % menos sacarosa que la cepa ATCC 9046, desarrollada en el mismo ambiente (condiciones diazotróficas).

Tabla 9.3. Parámetros de producción de alginato y características químicas de los alginatos sintetizados por la cepa silvestre ATCC 9046 y la cepa mutante ATCN4.

| Fuente de alginato | Condiciones de cultivo | Funcionalidad | | Características Químicas | | | | Producción | | |
|--|------------------------|------------------------------|-------------|--------------------------|---------------|--------------------|------------|-----------------------------|----------------------------------|--|
| | | K (mPa*s ⁿ) | *G* (Pa) | PMP máximo (kDa) | IP min (-) | Acetilación (%) | G/M (-) | Alginato máximo (g/L) | $Y_{\text{Alginato/X}}$ (g/g) | Consumo de fuente de carbono (g/L) |
| ATCC 9046 | No Diazotróficas | 117 | 6.6 | 1440 ± 193 | 2.5 - 5.2 | 13.3 ± 2 | 3 ± 0.4 | 3.7 ± 0.25 | 4.5 ± 0.5 | 14.4 ± 0.8 |
| ATCN4 | | 74 | 3 | 1587 ± 192 | 2.5 - 6.4 | 0 | 4.6 ± 0.4 | 4.3 ± 0.12 | 3.9 ± 0.3 | 11.8 ± 1.5 |
| ATCC 9046 | Diazotróficas | 236 | 0.4 | 900 ± 48 | 4.8 - 5.7 | 12 ± 0.4 | 4.6 ± 0.6 | 1.8 ± 0.2 | 2.65 ± 0.02 | 10.8 ± 1.3 |
| ATCN4 | | 352 | 6.4 | 2300 ± 300 | 3.8 - 4.3 | 4.6 ± 0.31 | 2.6 ± 0.5 | 2.85 ± 0.12 | 4.5 ± 0.34 | 7 ± 1 |
| <i>Macrocystis pyrifera</i> (Bajo peso molecular) [♦] | Comercial | 9 [‡] | 0.16 | 402 | 1.5 - 3 | 0 | 0.63 - 1.7 | NA | NA | NA |
| <i>Macrocystis pyrifera</i> (Peso molecular medio) [♦] | | 13 [‡] | 1 | 626 | | 0 | | NA | NA | NA |

*NA: No aplica

[‡]Soluciones reconstituidas a concentración de 4 g/L, tomando como base la concentración más alta de alginatos bacterianos obtenida bajo condiciones no diazotróficas con la cepa mutante ATCN4.

[♦] Alginatos algales de Sigma – Aldrich.

[✱] Geles preparados con soluciones de alginato al 2 %.

En los resultados de la tabla 9.3 se presentó solo un ejemplo del potencial que ofrecen los alginatos bacterianos sobre los algales. Se demostró que es posible sintetizar alginatos bacterianos con propiedades cualitativas únicas y superiores a los productos comerciales. En teoría, por sus características químicas, los polímeros bacterianos podrían destinarse a industrias farmacéuticas o biotecnológicas, e incluso abrir nuevos mercados a precios relativamente altos. Existen diversos avances experimentales para emplearlos como fibra dietética, cápsulas para liberación prolongada de drogas e incluso como inmunoestimulante (Brownlee *et al*, 2005; Sriamomsak y Sungthongjeen, 2007; Draget y Taylor, 2011). Hasta ahora, se ha mencionado que no existe un proceso de producción competitivo para este tipo de polímeros, sin embargo, la empresa Dextra del Reino unido, comercializa polímeros no puros de *A.vinelandii*. Los precios de sus productos oscilan en los \$1400 pesos/g de alginato.

Caracterización cinética de la cepa mutante ATCN4

Se sabe que las mutaciones en el operón *nqr* originan fenotipos inesperados. Por ejemplo, en *V. cholerae* el bloqueo de Na⁺-NQR induce la síntesis de factores de virulencia (Häse y Mekalanos, 1999), mientras que en *A. vinelandii* genera una sobreproducción de alginato (Núñez *et al*, 2009). Sin embargo, la sobreproducción del polímero no es la única característica fenotípica de esta mutante. En el presente trabajo se generó información que demuestra el impacto de la mutación *nqrE* en el metabolismo de este microorganismo, en las características químicas de los alginatos que se sintetizan, así como del impacto sobre las propiedades funcionales de los polímeros obtenidos.

Crecimiento celular. El crecimiento celular se determinó mediante diferentes ensayos entre los que se encuentran los gravimétricos (peso seco). Sin embargo, debido a la acumulación de polímeros intracelulares (como el PHB), se decidió cuantificar el crecimiento en relación al contenido de proteína utilizando el método de Lowry. En cualquiera de las condiciones ambientales, la cepa mutante ATCN4 presentó una mayor síntesis de biomasa en comparación a la cepa silvestre (figura 9.7), sugiriendo que la falta en la actividad de la enzima Na⁺-NQR impacta positivamente el crecimiento celular. Como se mencionó en párrafos anteriores, la enzima Na⁺-NQR acopla la oxidación del NADH con el transporte de iones sodio del citoplasma al espacio periplásmico (Skulachev, 1989, Häse y Barquera, 2001), de forma que la enzima participa tanto en un proceso iónico como en uno energético. Así, la mutación en la cepa ATCN4 provocaría una acumulación interna del sodio que no es translocado e incluso posiblemente de poder reductor (figura 2.4).

Es probable que el mayor crecimiento celular de la mutante esté relacionado con un cambio iónico en el citoplasma, ya que trabajos como el de Page (1986) demostraron que el crecimiento de cepas de *A. chroococcum* (más tarde re-nombradas *A. salinestris* por Page, 1991) es dependiente o estimulado por la presencia de iones como sodio, litio y magnesio. Sin embargo, no se elucidó cómo es que el sodio u otros iones se conectan con el metabolismo celular para favorecer el crecimiento celular. En este sentido, trabajos previos al de Page (1991) en donde se evaluó el papel del Na⁺ y el K⁺ en el transporte y metabolismo de *A. vinelandii* (Postma *et al*, 1973; Viser y Postma, 1973), revelaron que en esta bacteria, la presencia de sodio y potasio estimulan la oxidación de algunos intermediarios del ciclo de Krebs. Así mismo, propusieron que el K⁺ es necesario intracelularmente para compensar la carga eléctrica de los intermediarios del ciclo de Krebs y otros aniones que se acumulan dentro de la célula. Finalmente, los autores proponen la existencia de una bomba de K⁺ ligada a la generación de energía en *A. vinelandii*. No obstante, sus datos no son suficientes para determinar el mecanismo principal de este fenómeno. Es probable que las investigaciones de Postma *et al* (1973) no solo sean uno de los

primeros antecedentes que revelen la importancia de los iones en el metabolismo de *A. vinelandii*, sino de la presencia de una bomba de iones asociada a un proceso energético.

Cabe mencionar que en otros organismos como *Escherichia coli* se ha encontrado que la estimulación en la oxidación es paralela a un incremento en el consumo de K^+ , sugiriendo la importancia de este ión al interior de la célula (Miller *et al*, 1964). De manera contraria, los resultados de Weiden *et al* (1967) permiten concluir que para el transporte de fosfato, este ion actúa principalmente de manera extracelular. Por su parte, Frank y Hopkins (1969) reportaron que el transporte de glutamato en *E. coli* se estimula por la presencia de Na^+ . Pese a los numerosos estudios realizados en este tema, actualmente no se ha concluido si los iones actúan intracelularmente estimulando la actividad de una o más enzimas conectadas con el metabolismo o si más bien se estimula el transporte de sustratos (Postma *et al*, 1973).

En otro sentido, Swan *et al* (1991) evaluaron el crecimiento celular de bacterias marinas cultivadas a diferentes concentraciones de NaCl. Dichas bacterias se clasificaron previamente como poseedoras o no poseedoras de una bomba primaria de Na^+ . Los autores, determinaron que de 27 cepas que poseen el complejo Na^+ -NQR, 22 de ellas requieren NaCl (> 0.5 %) para su crecimiento. Por su parte, Unemoto *et al* (1993) utilizando un análogo de un aminoácido no metabolizable, analizaron el efecto del Na^+ en el consumo de aminoácidos para bacterias moderadamente halófilas. Encontraron que de 8 cepas investigadas, 6 bacterias Gram-negativas que poseen la enzima Na^+ -NQR, requieren específicamente Na^+ para el consumo de aminoácidos. De lo anterior se puede deducir que en ambos casos existe una correlación entre la presencia de la enzima Na^+ -NQR con el crecimiento y con el consumo de aminoácidos.

Acumulación de PHB. Mediante el ensayo de Law y Slepecky (1961) aunado a una técnica cromatográfica, se cuantificó el porcentaje de acumulación de PHB. Se observó que bajo condiciones de cultivo no diazotróficas, no existe diferencia en el porcentaje máximo de PHB acumulado entre la cepa ATCN4 y la cepa ATCC 9046. Por el contrario, los experimentos en condiciones diazotróficas permitieron a la cepa mutante acumular 17 % más PHB que la cepa silvestre. Para ambas condiciones ambientales, el PHB acumulado en la mutante ATCN4 incrementa durante la fase exponencial de crecimiento, mientras que en la cepa silvestre el PHB permanece prácticamente constante a lo largo del cultivo.

En *A. vinelandii*, la síntesis del PHB se controla postranscripcionalmente a nivel de la actividad de la enzima β -cetotiolasa, la cual cataliza el primer paso en la síntesis de PHB. La limitación de

oxígeno es una de las condiciones que desencadenan la síntesis de este polímero. Cuando no existe dicha limitación, el acetil CoA es alimentado al ciclo de Krebs, resultando en que la CoA inhibe la actividad de la β -cetotilasa. Bajo condiciones de limitación de oxígeno y en presencia de un exceso de la fuente de carbono, el nivel de NAD(P)H incrementa, consecuentemente se inhiben las enzimas citrato sintasa e isocitrato deshidrogenasa, elevando los niveles de acetyl-CoA y disminuyendo los de CoA. De esta forma se contiene con la inhibición de la β -cetotilasa, lo cual permite la síntesis de PHB (Page y Knosp, 1989; Anderson y Dawes, 1990; Peralta-Gil *et al*, 2002).

Comúnmente se ha encontrado que el PHB comienza a sintetizarse hacia el final de la fase exponencial (Brivonese y Sutherland, 1989; Senior *et al*, 1972) o durante la fase estacionaria cuando ocurre el agotamiento de algún nutriente esencial, en presencia de un exceso de la fuente de carbono (Anderson y Dawes, 1990). Sin embargo, el trabajo de Page y Knosp (1989) demostró la posibilidad de un comportamiento diferente en la síntesis de PHB. Estos autores aislaron la cepa UWD, una mutante de *A. vinelandii* afectada en la cadena respiratoria, específicamente en una NADH oxidasa, capaz de producir PHB durante la fase exponencial de crecimiento. En este trabajo los autores encontraron que después de 24 horas de cultivo, el polímero representó alrededor del 70 % del peso seco. A la par, los autores examinaron las enzimas involucradas en de la síntesis de PHB, determinando una deficiencia en la actividad de la enzima citrato sintasa. Lo anterior, permitió a los autores plantear la posibilidad de que la mutación en la NADH oxidasa promoviera un incremento en la concentración de NADH, provocando así la inhibición de la enzima, uno de los requisitos necesarios para iniciar la síntesis de PHB. Esto apoya en parte a la hipótesis planteada al inicio de la descripción de resultados, donde se propuso la acumulación de PHB debido al bloqueo en el funcionamiento del complejo Na^+ -NQR. De acuerdo a lo anterior, es posible proponer que mutaciones en la cadena respiratoria de *A. vinelandii*, como en el caso de las cepas ATCN4 y UWD, afectan el metabolismo oxidativo provocando un incremento en el poder reductor que promueve la acumulación de PHB durante la fase exponencial de crecimiento.

Otro aspecto interesante, es el elevado porcentaje de PHB observado a las primeras horas de cultivo con la cepa silvestre bajo las condiciones de cultivo evaluadas (figura 9.8). Como ya se ha mencionado, la acumulación de PHB se origina como respuesta a una limitación nutricional y en presencia de un exceso de la fuente de carbono. También, es sabido que *A. vinelandii* presenta una alta actividad respiratoria (Dalton y Postgate, 1968; Oelze, 2000; Bertsova *et al*, 2001) ocasionando limitaciones de oxígeno desde etapas tempranas del cultivo (Díaz-Barrera *et al*, 2007). Lo anterior, podría explicar los altos niveles en la acumulación de PHB durante las primeras horas de fermentación

diazotrófica y no diazotrófica con la cepa ATCC 9046, debido posiblemente a una baja transferencia de oxígeno en el matraz. Además, sustenta la hipótesis de menor actividad respiratoria en la cepa mutante ATCN4. Al tener disminuida la respiración, las células agotarían gradualmente el oxígeno disuelto, dando como resultado el incremento gradual observado en los niveles de PHB (figura 9.8).

Síntesis de Alginato. El alginato producido en las diferentes condiciones ambientales por las cepas evaluadas se extrajo y cuantificó por la técnica de peso seco. Los resultados demostraron que no hubo mejoras en la producción por unidad celular de la cepa ATCN4 cuando se cultivó bajo condiciones no diazotróficas (figura 9.10a). Mientras que el ambiente diazotrófico permitió un notable incremento (~ 1.6 veces) en la producción del polímero por parte de la cepa ATCN4 (figura 9.10b) en comparación a los sintetizados por la cepa ATCC 9046. Recientemente se observó que la ausencia de la actividad en la enzima Na⁺-NQR en *A. vinelandii*, cultivada en medio sólido y bajo condiciones diazotróficas, resulta en un incremento en la producción de alginato (Núñez *et al*, 2009), atribuyendo dicho incremento a una posible regulación negativa. Es decir, que la ausencia del gradiente transmembranal de sodio puede ser una señal que desencadene la producción del polímero. Además, se propone que la regulación en la síntesis del alginato por la enzima Na⁺-NQR, es similar a la regulación de los factores de virulencia en *V. cholerae*, los cuales son positivamente controlados por la proteína ToxT. TcpP y TcpH son proteínas internas de membrana que controlan la transcripción de *toxT*. El trabajo de Häse y Mekalanos, (1999) ha sugerido que el complejo Na⁺-NQR juega un rol importante en la respuesta de la expresión de factores de virulencia ante cambios en la concentración de Na⁺. De modo que elevados niveles de este ión en el medio de cultivo disminuyen la habilidad de TcpP/H para activar *toxT*. Por el contrario, la pérdida en la actividad de la enzima Na⁺-NQR causa un incremento en la actividad de *toxT*, debido a que el efecto de este complejo es el de bombear Na⁺ fuera del citoplasma.

En *A. vinelandii*, el producto del gen *algU* que codifica para un factor sigma alternativo, es el responsable de iniciar la transcripción de *algD*, cuyo producto enzimático es clave en la biosíntesis del alginato. Los genes *alg8*, *alg44*, *algK* y *algJ* que se localizan inmediatamente abajo de *algD* están organizados en una unidad transcripcional (el operón *alg*) sus productos participan en la polimerización y secreción del alginato. Se sabe que la transcripción de *alg* puede ser inducida mediante condiciones ambientales como la deshidratación, limitación de nitrógeno y limitación de fósforo (Terry *et al*, 1990; Rehm y Valla, 1997). Además, estudios previos realizados por Berry *et al* (1989) demostraron que una alta osmolaridad en el medio de cultivo aumenta la transcripción del gen *algD* de una cepa mucoide de *P. aeruginosa*, lo que permitió incrementar la síntesis de alginato en un ambiente altamente salino. Este

al (1973) y Cárdenas (1997) apoyan esta hipótesis. Estos autores encontraron que la formación de la estructura de “caja de huevo” requiere asociaciones cooperativas de secuencias contiguas mayores a 20 monómeros G y que la presencia de secuencias M-G en el polímero actúan solubilizando la red tridimensional.

Análisis tecnológico de los alginatos sintetizados por las cepas ATCC 9046 y ATCN4.

Las aplicaciones tradicionales de los alginatos están relacionadas a su habilidad para retener agua y a sus propiedades gelificantes, viscosificantes y estabilizantes. Por otro lado, futuras aplicaciones biotecnológicas, se basan en efectos biológicos específicos de la molécula de alginato o en su transición sol/gel en presencia de iones calcio, lo que hace a los alginatos aptos como matrices de inmovilización para células.

La caracterización integral de la cepa ATCN4 y los alginatos que sintetiza permitió la obtención de parámetros significativos (tabla 9.3), que destacan principalmente la factibilidad para emplear microorganismos en la producción de alginatos con características superiores a los algales. De manera general, en la tabla 9.3 se observa que para una misma concentración de alginato, los polímeros sintetizados por las cepas silvestre ATCC 9046 y mutante ATCN4, confieren mayor capacidad viscosificante y gelificante que los alginatos comerciales. Este hecho, ofrece la ventaja de reducir la cantidad de producto requerido para determinada aplicación.

Respecto a la composición química, se aprecia una gran variabilidad entre los polímeros bacterianos (tabla 9.3). Se cuenta con alginatos de pesos moleculares entre 900 y 2300 kDa, IPs de 2.5 a 6, grados de acetilación que alcanzan valores máximos de 13 % y relaciones G/M en un intervalo de 2.6 a 4.6. Tecnológicamente, todos estos parámetros podrían resultar ventajosos para aplicaciones como agentes de liberación prolongada o materiales de inmovilización celular ya que determinan las características de difusión, porosidad, homogeneidad y estabilidad de la red de los geles (Martinsen *et al*, 1991; Draget *et al*, 1994; Draget y Taylor, 2006; Sriamomsak y Sungthongjeen, 2007). De acuerdo a los trabajos previos realizados por Martinsen *et al* (1987) y Sriamomsak y Sungthongjeen (2007), la utilidad de los alginatos como geles es resultado de una combinación de sus características moleculares. En cuanto al estudio de alginatos algales para la encapsulación de medicamentos, se ha

11. Conclusiones

- La mutación del gen *nqrE* en *A. vinelandii* favorece el crecimiento celular de la cepa ATCN4 en las condiciones de cultivo evaluadas.
- En ambiente diazotrófico, la mutación del gen *nqrE* en *A. vinelandii* promueve un incremento de 1.6 veces el rendimiento de alginato.
- Bajo las condiciones de cultivo evaluadas, la fuente de carbono y energía (sacarosa) es consumida por la cepa ATCN4 a bajas velocidades, ocasionando que la bacteria incorpore a su metabolismo menores concentraciones de sustrato respecto de la cepa silvestre ATCC 9046, esto indica que la mutación en el complejo enzimático $\text{Na}^+\text{-NQR}$ promueve el uso eficiente de la fuente carbonada. El sustrato metabolizado es desviado hacia la síntesis de proteína, PHB y preferencialmente hacia alginato.
- Las características químicas de los alginatos, como grado de acetilación, peso molecular y relación G/M, sintetizados por la cepa mutante ATCN4, se encuentran en función de las condiciones ambientales.
- La calidad reológica de los alginatos en solución producidos por la cepa silvestre ATCC 9046 y la cepa mutante ATCN4 depende de la concentración y una combinación de características químicas específicas.
- Los geles preparados a partir de soluciones reconstituidas de alginatos bacterianos (2 %) son más firmes comparados con los geles de alginatos algales comerciales, elaborados a la misma concentración.
- Las propiedades funcionales: índice de consistencia y viscoelasticidad de los alginatos bacterianos, demostraron tener potencial de aplicación a nivel comercial.
- La información de las características cinéticas de la cepa mutante ATCN4, tales como mayor crecimiento celular, producción de alginato y consumo eficiente de la fuente de carbono, aunada a las peculiaridades en la estructura química de la molécula de los alginatos producidos por esta cepa, sugieren que el complejo enzimático $\text{Na}^+\text{-NQR}$ juega un papel muy importante en el metabolismo de *A. vinelandii*.

12. Perspectivas

- Se plantea realizar estudios sobre el efecto de la respiración en la cinética de crecimiento y producción de alginato de *A. vinelandii*. Para esto se sugiere generar mutantes afectadas en la cadena respiratoria.
- Con la finalidad de comprender los efectos de la mutación en el gen *nqrE*, se plantea realizar un análisis transcriptómico de los genes involucrados en la síntesis y modificación del alginato bajo diferentes condiciones ambientales, variando la fuente de nitrógeno.
- Para continuar la evaluación tecnológica de alginatos bacterianos, se propone realizar caracterizaciones cinéticas, químicas y reológicas de los alginatos producidos por diferentes cepas mutantes, principalmente aquellas que tienen afectados genes que participan en la edición del alginato.

13. Referencias

- Anderson, A., Dawes, E. (1990) Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiology Reviews* 54: 450 – 472.
- Annisson, G., Couperwhite, I. (1986) Influence of calcium on alginate production and composition in continuous cultures of *A. vinelandii*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 25: 55 – 61.
- Barnes, H.A. (2000) Polymer Rheology. In: A Handbook of Elementary Rheology. The University of Wales Institute of Non-Newtonian Fluid Mechanics. ISBN 0-9538032-0-1.
- Berry, A., DeVault, J.D., Chakrabarty, A.M. (1989) High osmolarity is a signal for enhanced *algD* transcription in mucoid and non mucoid *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Journal of Bacteriology* 171: 2312 – 2317.
- Bertsova, Y.V., Bogachev, A. (2004) The origin of the sodium dependent NADH oxidation by respiratory chain of *Klebsiella pneumoniae*. *FEBS Letters* 207 – 212.
- Bertsova, Y.V., Bogachev, A., Scudlachev, V.P. (2001) Nuncoupled NADH: Ubiquinoneoxidoreductase of *Azotobacter vinelandii* is required for diazotrophic growth at high oxygen concentrations. *Journal of Bacteriology* 183: 6869 – 6874.
- Blumenkrantz, N., Asboe-Hansen, G. (1973) New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry* 54: 484 – 489.
- Bogachev, A.V., Bertsova, Y.V., Ruuge, E.K., Wilkstrom, M., Verkhovsky, M.I. (2001) Sodium – dependent steps in the redox reactions of the Na⁺-motive NADH: quinine oxidoreductasa from *Vibrio harveyi*. *Biochimica et Biophysica Acta* 40: 7318 – 7323.
- Boswell, C. (2002) Producers seek price increases in the nature alginates market. *Chemical market reporter* 262: 10 – 11.
- Brownlee, I.A., Allen, A., Pearson, J.P., Dettmar, P.W., Havler, M.E., Atherton, M.R., Onsoyen, E. (2005) *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 45: 497 – 510.
- Brivonese, A., Sutherland, I. (1989) Polymer production by a mucoid strain of *Azotobacter vinelandii* in batch culture. *Applied Microbiology and Biotechnology* 30: 97 – 102.
- Cárdenas, A. (1997) Reología y asociación molecular en solución de poliuronatos de origen diverso. Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C.
- Cheetham, N.W.H., Punruckvong, A. (1985) An HPLC method for the determination of acetyl and pyruvyl groups in polysaccharides. *Carbohydrate Polymers* 5: 399 – 406.
- Clark, A.H., Richards, R.K., Ross-Murphy, S.B., Stubbs, J.M. (1983) Structural and mechanical properties of agar/gelatin co-gels. Small deformation studies. *Macromolecules* 16: 1367 – 1374.
- Clementi, F. (1997) Alginate production by *Azotobacter vinelandii*. *Critical Reviews in Biotechnology* 17: 327 – 61.

- Clementi, F., Mancini, M., Moresi, M. (1998) Rheology of alginate from *Azotobacter vinelandii* in aqueous dispersions. *Journal of Food Engineering* 36: 51 – 62.
- Dalton, H., Postgate, J.R. (1968) Effect of oxygen on growth of *Azotobacter chroococcum* in batch and continuous cultures. *Journal of General Microbiology* 54: 463 – 473.
- Díaz-Barrera, A., Peña, C., Galindo, E. (2007) The oxygen transfer rate influences the molecular mass of the alginate produced by *Azotobacter vinelandii*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 76: 903 – 910.
- Draget, K., Smidsrod, O., Skjak-Braek, G. (1994) Alginic acid gels: the effect of alginate chemical composition and molecular weight. *Carbohydrate polymers* 25: 31 – 38.
- Draget, K., Smidsrod, O., Skjak-Braek, G. (2002) Alginates from algae. In: Biopolymers. De Baets S, Vandamme E, Steinbüchel A (Eds), WILEY-VCH, Volume 6, pp. 215 – 242.
- Draget, K., Smidsrod, O., Skjak-Braek, G., Stokke, T.B. (2006) Similarities and differences between alginic acid gels and ionically crosslinked alginate gels. *Food Hydrocolloids* 20: 170 – 175.
- Draget, K., Taylor, K. (2011) Chemical, physical and biological properties of alginates and their biomedical implications. *Food Hydrocolloids* 25: 251 – 256.
- Espín, G. (2002) Biología de *Azotobacter vinelandii*. En: Microbios en línea. <http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/index.html>. Marzo de 2012.
- Fadeeva, M.S., Núñez, C., Bertsova, Y.V., Espín, G., Bogachev, A.V. (2008). Catalytic properties of Na⁺- translocating NADH: quinone oxidoreductase from *Vibrio Harvey*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Azotobacter vinelandii*. *FEMS Microbiology Letters* 279: 116 – 123.
- Ferry, J.D. (1980) Viscoelastic properties of polymers. John Wiley (Eds). New York. pp. 5 – 31.
- Frank, L., Hopkins, I. (1969) Sodium stimulated transport of L-glutamate in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 100: 329 – 336.
- Gacesa, P. (1998) Bacterial alginate biosynthesis: recent progress and future prospects. *Microbiology* 144: 1133 – 1143.
- Galindo, E., Peña, C., Núñez, C., Segura, D., Espín, G. (2007) Molecular and bioengineering strategies to improve alginate and polyhydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii*. *Microbial Cell Factories* 6: 1 – 16.
- Geddie, J.L., Sutherland, I.W. (1994). The effect of acetylation on cation binding by algal and bacterial alginates. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 20: 117 – 129.
- Goring, J.P., Spencer, T. (1966) Exocellular alginic acid from *Azotobacter vinelandii*. *Canadian Journal of Chemistry* 44: 993 – 998.
- Grant, G.T., Morris, E.R., Rees, D.A., Smith, P.J.C., Thom, D. (1973) Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg box model. *FEBS Letters* 32: 195 – 198.
- Häse, C.C., Barquera, B. (2001) Role of sodium bioenergetics in *Vibrio cholerae*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1505: 169 – 178.

- Häse, C.C., Mekalanos, J.J. (1999) Effects of changes in membrane sodium flux on virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *Proceedings of the National Academy of the Sciences of the United States of America* 96: 3183 – 3187.
- Haug, A., Larsen, B. (1962) Quantitative determination of the uronic acid composition of alginates. *Acta Chemica Scandinavica* 16: 1908 – 1918.
- Haug, A., Smidsrod, O. (1965) The effect of divalent metals on the properties of alginate solutions. II Comparison of different metal ions. *Acta Chemica Scandinavica* 19: 341 – 351.
- Hayashi, M., Hirai, K., Unemoto, T. (1995) Sequencing and the alignment of structural genes in the *nqr* operón encoding the Na⁺- translocating NADH-quinone reductase from *Vibrio Alginolyticus*. *FEBS Letters* 363: 75 – 77.
- Horan, N.J., Jarman, T.R., Dawes, E.A. (1981) Effects of carbon sources and inorganic phosphate concentration on the production of alginic acid by a mutant of *Azotobacter vinelandii* and on the enzyme involved in its biosynthesis. *Journal of General Microbiology* 127: 185 – 191.
- Horan, N.J., Jarman, T.R., Dawes, E.A. (1983) Studies of some enzymes of alginic acid biosynthesis in *Azotobacter vinelandii* grown in continuous culture. *Journal of General Microbiology* 129: 2985 – 2990.
- Jarman, T.R., Deavin, L., Scolombe, S., Righelato, R.C. (1978) Investigation of the effect of environmental conditions on the rate of exopolysaccharide synthesis in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of General Microbiology* 107: 59 – 64.
- Juárez, O., Barquera, B. (2012) Insights into the mechanism of electron transfer and sodium translocation of the Na⁺- pumping NADH:quinone oxidoreductasa. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics*. En prensa.
- Karr, D., Waters, J., Emerich, D. (1983) Analysis of poly-β-hydroxybutyrate in *Rhizobium japonicum* bacteroids by ion-exclusion high-pressure liquid chromatography and UV detection. *Applied and Environmental Microbiology* 46: 1339 – 1344.
- Law, J.H., Slepecky, R.A. (1961). Essay of Poly-β-hydroxybutyric acid. *Journal of Bacteriology*. 82: 33 – 36.
- Lee, J.W., Ashby, R.D., Day, D.F. (1996) Role of acetylation on metal induced precipitation of alginate. *Carbohydrate polymers* 29: 337 – 345.
- Leitao, J.H., Flalho, A.M., Sá-Correia, I. (1992) Effects of growth temperature on alginate synthesis and enzymes in *Pseudomonas aeruginosa* variants. *Journal of General Microbiology* 130: 605 – 610.
- Leitao, J.H., Sá-Correia, I. (1993) Manipulation of *Pseudomonas aeruginosa* alginate pathway by varying the level of biosynthetic enzymes and growth temperature. *Journal of Applied Bacteriology* 74: 452 – 459.
- LeRoux, M.A., Guilak, F., Setton, L.A. (1999) Compressive and shear properties of alginate gel: Effects of sodium ions and alginate concentration. *Journal of Biomedical Material Research* 47: 46 – 53.

- Linker, A., Jones, R.S. (1964) A polysaccharide resembling alginic acid from a *Pseudomonas aeruginosa* microorganism. *Nature* 204: 187 – 188.
- Loginov, Y.O., Khudaigulov, G.G., Chetverikov, S.P., Melentev, A.I., Loginov, O.N. (2011) Biopolymer of alginate nature with a predominance of L-Guluronic acid. *Applied Biochemistry and Microbiology* 47: 343 – 347.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 193: 265 – 275.
- Luong, J.T., Mulchandani, A., Leduy, A. (1988) Kinetics of biopolymer synthesis: a revisit. *Enzyme and microbiology Technology* 10: 326 – 332.
- Malkin, A.Y., Isayev, A.I. (2006) Rheology. Concepts, Methods and Applications. ChemTec Publishing. ISBN 1-895198-33-X. Toronto, Canada.
- Mancini, M., Moresi, M., Sappino, F. (1996) Rheological behavior of aqueous dispersions of algal sodium alginates. *Journal of Food Engineering* 28: 283 – 295.
- Martinsen, A., Skjak-Braek, G., Smidsrod, O. (1991) Comparison of different methods for determination of molecular weight and molecular weight distribution of alginates. *Carbohydrate polymers* 15: 171 – 193.
- Maruyama, K., Kaibara, M., Fukada, E. (1974) Rheology of F – actin. *Biochimica et Biophysica Acta* 371: 20 – 29.
- McComb, E.A. y McCready, R.M. (1957) Determination of Acetyl in pectin and in acetylated alginate. *Carbohydrate polymers* 29: 819 – 821.
- Mejía, M.Á. (2008) Producción de alginato en cultivo lote alimentado mediante una cepa mutante de *Azotobacter vinelandii* incapaz de sintetizar poli - β - hidroxibutirato. Tesis de Maestría. Instituto de Biotecnología. UNAM.
- Mejía, M.Á., Segura, D., Espín, G., Galindo, E., Peña, C. (2010) Two-stage fermentation process for alginate production by *Azotobacter vinelandii* mutant altered in poly- β -hydroxybutyrate (PHB) synthesis. *Journal of Applied Microbiology* 108: 55 – 61.
- Miller, G. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry* 3: 426 – 428.
- Miller, S., Avi-Dor, Y., Mager, J. (1964) Studies on the mechanism of potassium-stimulated respiration in *Escherichia Coli*. *Journal of General Microbiology* 36: 123 – 131.
- Miranda, L. (1998) Evaluación de cepas mutantes de *Azotobacter vinelandii* en la producción de alginato. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Miranda-Medina, A., Peralta-Peláez, L., González-Valdés, A., García-Hernández, M., Sánchez-García, M. (2008) Diseño de una plata productora de ácido algínico y alginatos a partir de *Azotobacter vinelandii*. *Tecnología, Ciencia, Educación (IMIQ)*. 23: 91 – 98.
- Mitchell, P. (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature* (London). 191: 144 – 148.

- 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.
- Moresi, M., Bruno, M., Parente, E. (2004) Viscoelastic properties of microbial alginate gels by oscillatory dynamic tests. *Journal of Food Engineering* 64: 179 – 186.
- Moresi, M., Mancini, M., Bruno, M., Rancini, R. (2001) Viscoelastic properties of alginate gels by oscillatory dynamic tests. *Journal of Texture Studies* 32: 375 – 396.
- Murillo – Álvarez, J.I y Hernández – Carmona, G. (2007) Monomer composition and sequence of sodium alginate extracted at pilot plant scale from three commercially important seaweeds from Mexico. *Journal of Applied Physiology* 19: 545 – 548.
- Nakayama, Y., Hayashi, M., Unemoto, T. (1998) Identification of six subunits constituting Na⁺-translocating NADH-quinone reductase from the marine *Vibrio alginolyticus*. *FEBS Letters* 422: 240 – 242.
- Nivens, D.E., Ohman, D.E., Williams, J., Franklin, M. (2001) Role of alginate and its acetylation in formation of *Pseudomonas aeruginosa* microcolonies and biofilms. *Journal of Bacteriology* 183: 1047 – 1057.
- Núñez, C., Bogachev, A., Guzmán, G., Tello, I., Guzmán, J., Espín, G. (2009) The Na⁺-translocating NADH: ubiquinone oxidoreductase of *Azotobacter vinelandii* negatively regulates alginate synthesis. *Microbiology* 155: 249 – 256.
- Oelze, Jürgen. (2000) Respiratory protection of nitrogenase in *Azotobacter* species: is a widely held hypothesis unequivocally supported by experimental evidence?. *FEMS Microbiology Reviews* 24: 321 – 333.
- Page, W.J. (1986) Sodium-dependent growth of *Azotobacter chroococcum*. *Applied and Environmental Microbiology* 3: 510 – 514.
- Page, W.J. (1991) Examination of the role of Na⁺ in the physiology of the Na⁺ - dependent soil bacterium *Azotobacter salinestris*. *Journal of General Microbiology* 137: 2891 – 2899.
- Page, W.J., Knosp, O. (1989) Hyperproduction of pol-β-hydroxybutirate during exponential growth of *Azotobacter vinelandii* UWD. *Applied and Environmental Microbiology* 6: 1334 – 1339.
- Parente, E., Crudele, M., Aquino, M., Clementi, F. (1998) Alginate production by *Azotobacter vinelandii* DSM576 in batch fermentation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 20: 171 – 176.
- Peña, C., Campos, N., Galindo, E. (1997) Changes in alginate molecular mass distributions, broth viscosity and morphology of *Azotobacter vinelandii* cultured in shake flasks. *Applied Microbiology and Biotechnology* 48: 510 – 515.
- Peña, C. (1998) Producción de alginatos bacterianos por fermentación líquida: estudio de los factores determinantes en la biosíntesis de alginato producido por *Azotobacter vinelandii*. Tesis de Doctorado en Biotecnología. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.

- Peña, C., Hernández, L., Galindo, E. (2006) Manipulation of the acetylation degree of *Azotobacter vinelandii* alginate by supplementing the culture medium with 3- (N-morpholino) - propane-sulfonic acid. *Letters in Applied Microbiology* 43: 200 – 204.
- Peña, C., Miranda, L., Segura, D., Núñez, C., Espín, G., Galindo, E. (2002) Alginate production by *Azotobacter vinelandii* mutants altered in poly- β -hydroxybutyrate and alginate biosynthesis. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 29: 209 – 213.
- 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 and Microbial Technology* 27: 390 – 398.
- Peralta-Gil, M., Segura, D., Guzmán, J., Servín-González, L., Espín, G. (2002) Expression of the *Azotobacter vinelandii* Poly- β -hydroxybutyrate biosynthetic *phbBAC* operón is driven by two overlapping promoters and is dependent on the transcriptional activator PhbR. *Journal of bacteriology* 184: 5672 – 5677.
- 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*. *Biochemical Engineering Journal* 25: 187 – 193.
- Postma, P.W., Cools, W., Van Dam, K. (1973) The transport of Krebs-Cycle intermediates in *Azotobacter vinelandii* under metabolic conditions. *Biochimica Acta* 318: 91 – 104.
- Remminghorst, U. y Rehm, B. H. (2006) Bacterial alginates: from biosynthesis to applications. *Biotechnology Letters* 28:1701 – 1712.
- Rehm, B., Ertesvag, H., Valla, S. (1996) A new *Azotobacter vinelandii* mannuronan C-5-Epimerase gene (*algG*) is part of an alg gene cluster physically organized in a manner similar to that in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 178: 5884 – 5889.
- Rhem, B., Valla, S. (1997) Bacterial alginate: biosynthesis and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 48:281 – 288.
- Reyes, C., Peña, C., Galindo, E. (2003) Reproducing shake flasks performance in stirred fermentors: production of alginates by *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Biotechnology* 105: 189 – 198.
- Rich, P.R., Meunier, B., Ward, F.B. (1995) Predicted structure and possible ion motive mechanism of the sodium – linked NADH – ubiquinone oxido reductase of *Vibrio Alginolyticus*. *FEBS Letters* 375: 5 – 10.
- Richard, A., Margaritis A. (2003) Rheology, oxygen transfer, and molecular weight characteristics of poly (glutamic acid) fermentation by *Bacillus subtilis*. *Biotechnology and Bioengineering* 82: 299 – 305.
- Roberts, W.W., Kramer, O., Risser, R.W., Nestler, F.H.M., Ferry, J.D. (1974) Rheology of fibrin clots. I. Dynamic viscoelastic properties and fluid permeation. *Biophysical Chemistry* 1: 152 – 160.
- Sabra, W., Zeng, A-P., Deckwer, W-D. (2001) Bacterial alginate: physiology, product quality and process aspects. *Applied Microbiology and Biotechnology* 56: 315 – 325.

- Sabra, W., Zeng, A. P., Lünsdorf, H., Deckwer, W. D. (2000) Effect of oxygen on formation and structure of *Azotobacter vinelandii* alginate and its role in protecting nitrogenase. *Applied and Environmental Microbiology* 66:4037 – 4044.
- Sabra, W., Zeng, A-P., Sabry, S., Omar, S., Deckwer, W-D. (2001) Effect of phosphate and oxygen concentrations on alginate production and stoichiometry of metabolism of *Azotobacter vinelandii* under microaerobic conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology* 52: 773 – 780.
- Segura, D., Guzmán, J., Espín, G. (2003) *Azotobacter vinelandii* mutants that overproduce poly- β -hydroxybutyrate or alginate. *Applied Microbiology and Biotechnology* 63: 159 – 163.
- Senior, P.J., Beech, G.A., Rithchie, 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*. *Biochemical Journal* 128: 1193 – 1201.
- Serrano-Carreón, L., Corona, R.M., Sánchez A., Galindo E. (1998) Prediction of xanthanfermentation development by a model linking kinetics, power drawn and mixing. *Process Biochemistry* 33: 133 – 146.
- Sigma-Aldrich ® (2012). Catálogo en línea. En: www.sigmaaldrich.com/catalog.
- Skjak-Braek, G. (1992) Alginates: biosyntheses and some structure-function relationships relevant to biomedical and biotechnological applications. *Biochemical Society Transactions* 20: 27 – 33.
- Skjak-Braek, G., Larsen, B., Grasdalen, H. (1985). The role of β -acetyl groups in the biosynthesis of alginate by *Azotobacter vinelandii*. *Carbohydrate Research* 145: 169 – 174.
- Skjak-Braek, Zanetti, F.H., Paoletti, S. (1989) Effect of acetylation on some solutions and gelling properties of alginates. *Carbohydrate Research* 185: 131 – 139.
- Skulachev, V. P. (1989) The sodium cycle: a novel type of bacterial energetics. *Journal of Bioenergetics and Biomembrane* 21: 635 – 647.
- Sriamomsak, P., Sungthongjeen, S. (2007) Modification of the theophylline release with alginate gel formed in hard capsules. *American Association of Pharmaceutical Scientist Pharmaceutical Science and Technology* 8: E1 – E8.
- Steinbüchel, A. (2001) Polyhydroxyalkanoate biosynthesis pathways as a successful example. *Macromolecular Bioscience* 1: 1 – 24.
- Sutherland, I.W. (1977) Microbial exopolysaccharide synthesis. In: Sandford P.A., Laskin, A. (Eds) *Extracellular Microbial Polysaccharides*. American Chemical Society, Washington D.C.
- Sutherland, I.W. (1994) Structure-function relationships in microbial exopolysaccharides. *Biotechnology Advances* 12: 393 – 448.
- Suwan, O.H., Kazuhiro, K., Kouichi, O., Usio, S. (1991) Correlation between possession of a respiratory-dependent Na^+ pump and Na^+ requirement for growth of marine bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 1844 – 1846.
- Terry, J.M., Piña, E.S., Mattingly, S.J. (1991) Environmental conditions which influence mucoid conversion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Infection and Immunity* 59: 471 – 477.

- Tinoco, R. (1993) Obtención de alginatos bacterianos por fermentación líquida de *Azotobacter vinelandii*. Tesis de Maestría. Programa de Biotecnología, UNAM.
- Tokuda, H., Unemoto, T. (1984) Na⁺ is translocated at NADH:quinone oxidoreductase segment in the respiratory chain of *Vibrio alginolyticus*. *Journal of Biological Chemistry* 259: 7785 – 7790.
- 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*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 63: 742 – 747.
- Trujillo-Roldán, M., Moreno, S., Segura, D., Galindo, E., Espín, G. (2003) Alginate production by an *Azotobacter vinelandii* mutant unable to produce alginate lyase. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60: 733 – 737.
- Unemoto, T., Akagawa, A., Hayashi, M. (1993) Correlation between the respiratory-driven Na⁺-pump and Na⁺-dependent amino acid transport in moderately halophilic bacteria. *Journal of General Microbiology* 139: 277 – 2782.
- Unemoto, T., Hayashi, M., Hayashi, M. (1977) Na⁺-dependent activation of NADH oxidase in membrane fractions from halophilic *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio costicola*. *The Journal of Biochemistry* 82: 1389 – 1395.
- Valla, S., Li, J., Ertesvag, H., Barbeyron, T., Lindahl, U. (2001) Hexuronyl C5-epimerases in alginate and glycosaminoglycan biosynthesis. *Biochimie* 83: 819 – 830.
- Vázquez, A., Moreno, S., Guzmán, J., Alvarado, A., Espín, G. (1999) Transcriptional organization of the *Azotobacter vinelandii* algXLVIFA genes: characterization of algF mutants. *Gene* 232: 217 – 222.
- Verkhovsky, M.I., Bogachev, A.V. (2010) Sodium-translocating NADH: quinone oxidoreductase as a redox-driven ion pump. *Biochimica et Biophysica Acta* 1797: 738 – 746.
- Visser, A. S., Postma, P.W. (1973) Permeability of *Azotobacter vinelandii* to cations and anions. *Biochimica et Biophysica Acta* 298: 333 – 340.
- Weiss, M., Ollis, D.F. Extracellular microbial polysaccharides I. Substrate, biomass and product kinetic equations for batch xanthan gum fermentation. *Biotechnology and Bioengineering* 12: 854 – 873.
- Weiden, P.L., Epstein, W., Schultz, S.G. (1967) Cation transport in *Escherichia coli*. VII. Potassium requirement for phosphate uptake. *The Journal of General Physiology* 50: 1641 – 1661.
- Zertuche-González, F. (1994) Situación actual de las algas productoras de ficocoloides en México. Programa Cooperativo Gubernamental, FAO-Italia. Proyecto Aquila II.
- Zhu, W., Latridis, J.C., Hibczuk, V., Ratcliffe, A., Mow, V.C. (1996) Determination of collagen – proteoglycan interactions *in vitro*. *Journal of Biomechanics* 29: 773 – 783.

Zhu, W., Mow, V.C., Rosenberg, L.C., Tang, L.H. (1994) Determination of kinetic changes of aggrecan – hyaluronan interactions in solution from its rheological properties. *Journal of Biomechanics* 27: 571 – 579.

14. Anexo

World J Microbiol Biotechnol (2012) 28:2731–2740
DOI 10.1007/s11274-012-1084-4

ORIGINAL PAPER

Azotobacter vinelandii lacking the Na⁺-NQR activity: a potential source for producing alginates with improved properties and at high yield

Itzel Gaytán · Carlos Peña · Cinthia Núñez ·
María S. Córdova · Guadalupe Espín ·
Enrique Galindo

Received: 27 February 2012 / Accepted: 17 May 2012 / Published online: 7 June 2012
© Springer Science+Business Media B.V. 2012

Abstract The mutant ATCN4 strain of *Azotobacter vinelandii*, which lacks the Na⁺-NQR activity and results in an alginate overproduction (highly mucoid phenotype), was cultured in shake flasks in minimal and rich medium, and the chemical composition and rheological properties of the alginate were determined. Mutant ATCN4 exhibited a high efficiency for sucrose conversion to alginate and PHB accumulation, reaching yields that were 3.6- and 1.6-fold higher than those obtained from the wildtype cultures in minimal medium (Burk's sucrose, BS). The alginate produced by ATCN4 in the minimal medium had a high degree of acetylation ($\geq 4\%$) and a low G/M ratio (=2) with respect to the polymer synthesised in the rich medium (BS with yeast extract) (degree of acetylation = 0% and G/M ratio of 4.5). The alginate produced in the minimal medium exhibited a pronounced pseudoplastic behaviour and a higher G* module in comparison to that observed in the alginate obtained in the cultures using a rich medium. The ATCN4 mutant culture in the minimal medium promoted the synthesis of a polymer of improved rheological quality in terms of its mechanical properties. These characteristics make this mutant a valuable source for producing alginates with improved or special properties.

Keywords Alginate · *A. vinelandii* · Na⁺-NQR activity · Viscosity · Degree of acetylation

Introduction

Alginate is a polysaccharide composed of variable amounts of β -D-mannuronic acid and its C5-epimer, the α -L-guluronic acid linked by 1-4 glycosidic bonds. The monomers are distributed in blocks of continuous mannuronate (M) residues, guluronate (G) residues or alternating residues (MG) (Draget and Taylor 2011). These polymers have been used in a wide range of applications, acting as stabilising, thickening or gel- or film-forming agents, in various industrial fields (Galindo et al. 2007; Peña et al. 2011a). Additionally, there are still new applications being discovered, such as their use as a source of soluble fibre or in medical products (Galindo et al. 2007).

New applications of the alginates are determined by the chemical composition and the molecular mass of the polymers. For example, it has been shown that alginates with a high proportion of mannuronate residues are able to induce cytokine production and may stimulate Toll-like receptors during the immunological response (Draget and Taylor 2011). In addition, alginate oligoguluronates are able to modify the mucin polymer network structures in the mucus of some organs, which opens new possibilities for the treatment of some respiratory diseases by increasing the mucosal uptake of some drugs or improving their bioavailability, and by decreasing the viscosity of the sputum (Draget and Taylor 2011). It is known that the effectiveness of an alginate as a support for the immobilisation of cells and drugs depends on the molecular mass of the polymer and on the relative content of the two monomers (Hernández et al. 2010).

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

C. Núñez · G. Espín
Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Post. 510-3, 62250 Cuernavaca, Morelos, México

 Springer

Currently, most of the alginate produced commercially is still obtained from brown algae, although it is subjected to variations in quality and quantity due to changes of climate and the type of algae (Sabra et al. 2001). Alginate can also be produced by a non-pathogenic soil bacterium, such as *Azotobacter vinelandii*. This bacterium also produces poly- β -hydroxybutyrate (PHB), which is a polymer in the polyhydroxyalkanoate (PHA) family of polyesters that are synthesised by a wide range of bacterial and archaeal species to form carbon and energy reserve materials (Peña et al. 2011a).

An interesting strategy to improve the alginate production and to obtain polymers with well-defined chemical characteristics is the construction of *A. vinelandii* mutants (Galindo et al. 2007). For example, inhibition of the synthesis of PHB has been able to increase the alginate yield in cultures both in shake flasks and in agitated bioreactors (Peña et al. 2002; Segura et al. 2003; Mejía et al. 2010).

Another strategy employed to improve the alginate production was to increase the transcription of the *algD* gene (encoding GDP mannose dehydrogenase, the key enzyme in alginate biosynthesis). Therefore, the mutant CN26, which contains a mutation (*muc26*) that increases the transcription of the *algD* gene, was generated. Although a high alginate concentration (7 g L^{-1}) was obtained by culturing this mutant in shake flasks. Under controlled conditions of pH (7.2), agitation rate (300 rpm) and dissolved oxygen tension (DOT) (3 % DOT), this *muc26* mutant did not improve the volumetric production of alginate when compared to the wildtype ATCC 9046 strain (Peña et al. 2002).

On the other hand, Trujillo-Roldán et al. (2003) reported that by using the mutant SML2, which carries a non-polar mutation within *algL* (gene encoding for an alginate lyase), it was possible to produce an alginate with a high molecular mass (1,240 kDa) with respect to that obtained with the parental strain ATCC 9046 (680 kDa). A more comprehensive review regarding the use of mutant strains for alginate and PHB production can be found in Galindo et al. (2007) and Díaz-Barrera and Soto (2010).

Recently, our group reported the isolation of an *A. vinelandii* Tn5 mutant, named ATCN4, that showed an alginate-overproducing phenotype (Núñez et al. 2009). ATCN4 carries an insertion within the *nqrE* gene, which encodes a subunit of the Na^+ -translocating NADH:ubiquinone oxidoreductase (Na^+ -NQR) complex, thus suppressing its activity. The Na^+ -NQR complex is a redox-driven sodium pump comprised of six subunits, NqrA–F, which are encoded in the *nqr* operon (Hayashi et al. 1995; Rich et al. 1995; Nakayama et al. 1998). This enzyme couples the exergonic oxidation of NADH with ubiquinone to the transport of Na^+ from the cytoplasm to the periplasmic space (Skulachev 1989). Thus, the Na^+ -NQR

complex diminishes the internal Na^+ concentration and contributes to the generation of an electrochemical Na^+ potential that is involved in solute import, ATP synthesis and flagellar rotation in several bacterial species (Skulachev 1989).

The ATCN4 mutant showed a fourfold increase in the specific alginate production in BS minimal medium (diazotrophic conditions) when compared to the parental strain ATCC 9046 after 48 h of growth on agar plates containing BS medium ($3,200$ vs. $800 \mu\text{g alginate mg protein}^{-1}$). These data suggested that the Na^+ -NQR complex negatively regulates alginate synthesis and that the absence of a transmembrane sodium gradient could be a signal that triggers the production of the polymer, although this remains to be investigated (Núñez et al. 2009).

However, it has become evident (Galindo et al. 2007) that to fully evaluate the potential of mutant strains, agar plate cultures have serious limitations because the conditions in the solid medium can be dramatically different from those occurring in a submerged culture, which is the fermentation system that will be used if the alginate production at a commercial level is eventually carried out. Therefore, liquid cultures should be used to characterise the actual potential of the mutant strains of *A. vinelandii*.

In the present study, the performance of mutant ATCN4 of *A. vinelandii* was compared with the wildtype strain (ATCC 9046) in shake flasks under the conditions previously used to characterise the mutant ATCN4 culture (minimal medium) (Núñez et al. 2009). Additionally, the mutant was cultured using a rich medium (BS, supplemented with yeast extract), which has been shown to promote the production of alginate by *A. vinelandii*. The alginate produced was characterised in terms of its chemical composition (acetylation and G/M ratio), molecular mass and rheological properties.

Materials and methods

Microbial strains and culture conditions

The *A. vinelandii* strains used in this investigation were the wildtype ATCC 9046 strain and its derivative, the mutant ATCN4 (*nqrE::Tn5*) strain (Núñez et al. 2009). The cells were cryopreserved at $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ in a 40 % glycerol solution and maintained by monthly subcultures on Burk's agar slopes stored at $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Cultures were performed in 500-mL Erlenmeyer flasks, which contained 100 mL of culture medium, at 200 rpm and $29 \text{ }^\circ\text{C}$ for 72 h in an orbital shaking incubator. *A. vinelandii* was grown in a modified Burk's medium (BS) (Peña et al. 1997). In some experiments, the medium was supplemented with 3 g L^{-1} of yeast extract. The initial pH level was adjusted to 7.2 by

using NaOH (2 N). Each flask was inoculated with 0.1 g L^{-1} of cells grown for 24 h in shake flasks in the same medium and conditions as mentioned above. All experiments were conducted in triplicate, and the results presented are the average of the independent runs. Figures show the mean values and the standard deviation among the replicates.

Analytical determinations

The biomass concentration was determined by the Lowry method (Lowry et al. 1951). The cell dry weight and alginate concentrations were determined gravimetrically, as described previously (Peña et al. 2000; Díaz-Barrera et al. 2007). Sucrose was assayed for reducing power with the DNS reagent. Samples were previously hydrolysed by using β -fructofuranosidase (Gist Brocades) to generate glucose and fructose and then assayed for reducing power with the DNS reagent (Miller 1959). The specific growth rate (μ) was calculated using the logistic model that was reported previously by Klimek and Ollis (1980). Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) was quantified as crotonic acid, which is a hydrolysis product of PHB by following previously described methods (Karr et al. 1983; Díaz-Barrera et al. 2007).

Characterisation of the alginate

The mean molecular mass of the alginate was estimated by GPC with a serial set of ultrahydrogel columns (UG 500 and Linear, Waters) by using an HPLC system with a differential refractometer detector (Waters, 410). Further details of the technique are reported elsewhere (Díaz-Barrera et al. 2007). The degree of acetylation was determined by HPLC using an Aminex 87H column (Bio-Rad) and a photodiode array detector (Waters 2996), as described previously by our group (Peña et al. 2011b). The ratio of L-guluronic acid and D-mannuronic acid (G/M ratio) was estimated by a colorimetric reaction of carbazole according to the method reported by Knutson and Jeanes (1968).

Rheological analysis

Viscosity measurements

The viscosity measurements of the culture broths and the alginate solutions were determined using a cone/plate rheometer AR1000 (TA Instruments) with a stainless steel cone (1° 60 mm) at a constant temperature of 25°C . Measurements were performed at shear rates between 0.5 and $1,500 \text{ s}^{-1}$. The dependency of the viscosity on the shear rate was described by the Ostwald-de Waele model ("power law"), as follows:

$$\eta = K\dot{\gamma}^{m-1} \quad (1)$$

where η is the viscosity (Pa s), K is the consistency index (Pa s^m) and m is the flow behaviour index ($-$).

In addition, a rheological measurement of the modified Burk's medium, which contained 20 g L^{-1} of sucrose, was used as a control. The data showed a Newtonian flow behaviour with a viscosity similar to that determined in water ($\sim 1 \text{ mPa s}$).

Viscoelastic properties

The dynamic storage modulus (G') and loss modulus (G'') were determined for 2 % (w/v) alginate solutions, which were mixed with a CaCl_2 (0.7 M) solution. These measurements were performed by a frequency sweep in an AR1000 (TA Instruments) Rheometer equipped with a plate-plate measuring geometry. The operational parameters were as follows: the frequency was 1 Hz, strain was 0.6, torsion bar was 4 g cm and temperature was 25°C .

Results

Kinetics of growth, alginate and PHB production: ATCN4 mutant vs. ATCC 9046 wildtype strain

Because the alginate-overproducing phenotype of mutant ATCN4 was observed on plates of minimal BS media (without a nitrogen source) (Núñez et al. 2009), the first analysis on the performance of this mutant was compared to the wildtype strain in liquid BS medium. Figure 1 shows the growth kinetics, alginate and PHB (poly- β -hydroxybutyrate) production, and sucrose consumption by the ATCN4 mutant and the wildtype ATCC 9046 strains. Higher maximum biomass concentration (measured as protein content) and specific growth rate (μ) were achieved from the ATCN4 mutant cultures (Fig. 1a). Upon using this mutant strain, the μ was 0.05 h^{-1} with a maximum protein concentration of 0.7 g L^{-1} compared to 0.04 h^{-1} and 0.48 g L^{-1} , respectively, for cultures of the ATCC 9046 strain. Observations under the microscope indicated that the ATCN4 cells had the typical morphology of cells that accumulate PHB; therefore, the PHB accumulation was followed in the cultures, and the results are shown in Fig. 1b. The PHB content in the ATCC 9046 cells remained constant at approximately 40–55 %, whereas in the case of the ATCN4 cultures, the percentage of PHB increased during the exponential growth phase and reached a maximum of 66 % after 48 h of cultivation.

Figure 1c shows the evolution of the alginate concentration during the course of the culturing of both strains. A maximum alginate concentration of 2.85 g L^{-1} was obtained

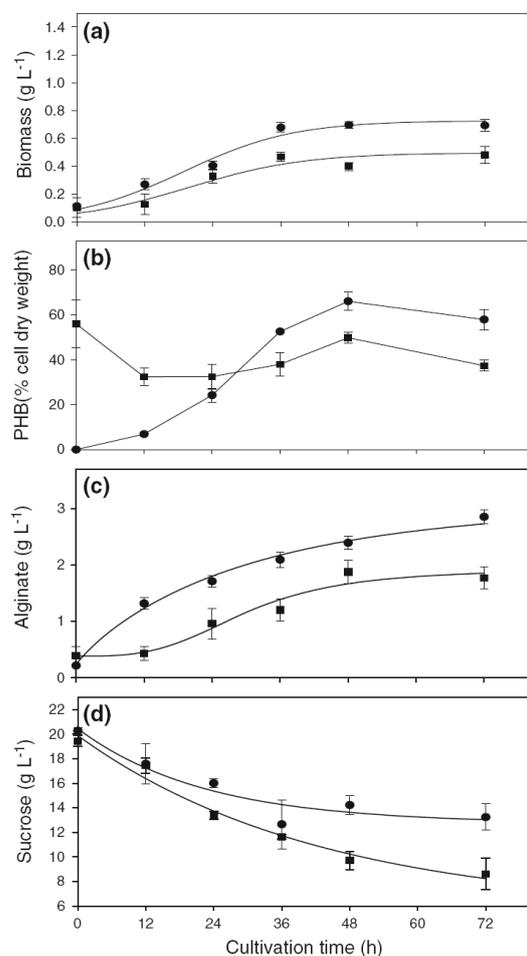


Fig. 1 Kinetics of biomass growth (a), PHB production (b), alginate production (c), and sucrose uptake (d) of cultures of the ATCC9046 (filled square) and ATCN4 (filled circle) strains conducted in shake flasks in BS minimal medium

in the cultures conducted with the ATCN4 mutant after 72 h of cultivation. However, at the same fermentation time, only 1.8 g L⁻¹ of alginate was produced by the wildtype strain. In both cases, the alginate production was partially growth-associated, and a significant fraction (approximately 50 %) of the total alginate synthesis occurred during the stationary growth phase. It is important to note that the alginate yield on the biomass ($Y_{\text{alginate/biomass}}$) in the cultures of the ATCN4 mutant was almost twice (4.5) that of the cultures of the ATCC 9046 (2.9). The sucrose consumption was different for the ATCN4 and ATCC 9046 strains (Fig. 1d). The mutant ATCN4 metabolised only 30 % (7 g L⁻¹) of the total sucrose in the culture broth at a specific consumption rate (SCR) of 0.38 g sucrose g cell⁻¹ h⁻¹. In contrast, the ATCC

Table 1 The biomass yields on sucrose ($Y_{x/s}$), alginate yield on sucrose ($Y_{\text{alg/s}}$), PHB yield on sucrose ($Y_{\text{PHB/s}}$) and global yield (Y_{global}) calculated for the cultures of the ATCN4 mutant and ATCC 9046

| Strain | $Y_{x/s}$ | $Y_{\text{alg/s}}$ | $Y_{\text{PHB/s}}$ | Y_{global} |
|-----------|--------------|--------------------|--------------------|---------------------|
| ATCC 9046 | 0.04 ± 0.003 | 0.13 ± 0.024 | 0.059 ± 0.007 | 0.25 |
| ATCN4 | 0.08 ± 0.006 | 0.48 ± 0.012 | 0.096 ± 0.007 | 0.66 |

9046 strain consumed 59 % (10.8 g L⁻¹) of the carbon source at a SCR of 0.48 g sucrose g cell⁻¹ h⁻¹.

The distribution of sucrose in different products, which is expressed as yields of alginate ($Y_{\text{alginate/sucrose}}$), PHB ($Y_{\text{PHB/sucrose}}$), biomass ($Y_{\text{biomass/sucrose}}$) and the global yield (equivalent to the sum of previous yields), were calculated and compared to those determined for the wildtype strain. As shown Table 1, the yields of alginate, PHB and biomass were higher in the ATCN4 cultures. For example, the alginate yield was 0.48 g alginate g sucrose⁻¹ in the ATCN4 cultures, whereas the yield was only 0.13 g alginate g sucrose⁻¹ in the wildtype cultures. For the PHB yield, the mutant reached a maximum of 0.096 g PHB g sucrose⁻¹, which was two times higher than that estimated for the wildtype strain. As a consequence, the sucrose global yield was close to threefold higher for the ATCN4 mutant, with respect to that obtained using the wildtype strain.

ATCN4 cultured in rich medium (Burk's sucrose supplemented with yeast extract)

It is known that the use of yeast extract in the medium favours the production of alginate by *A. vinelandii* (Clementi 1997; Zapata-Vélez and Trujillo-Roldán 2010). Therefore, the biomass growth and alginate and PHB production by the mutant strain was evaluated in BS medium supplemented with yeast extract. It is clear from Fig. 2 that the addition of yeast extract to the medium promoted biomass growth and alginate synthesis when the ATCN4 mutant was employed. Under this condition, the mutant ATCN4 strain was able to produce a maximum biomass concentration of 1.2 g L⁻¹ (Fig. 2a), which was 79 % higher than that obtained in the minimal BS media. Additionally, the results depicted in Fig. 2b show the evolution of the alginate production. The alginate isolated from the cultures with yeast extract reached a maximum concentration of 4.3 g L⁻¹, which was 50 % more than that obtained in the cultures without yeast extract. For PHB, the mutant ATCN4 strain cultivated with yeast extract accumulated approximately 25 % less PHB (40 % w/w) with respect to the cultures without yeast extract (66 % w/w) after 48 h of cultivation (Fig. 2c).

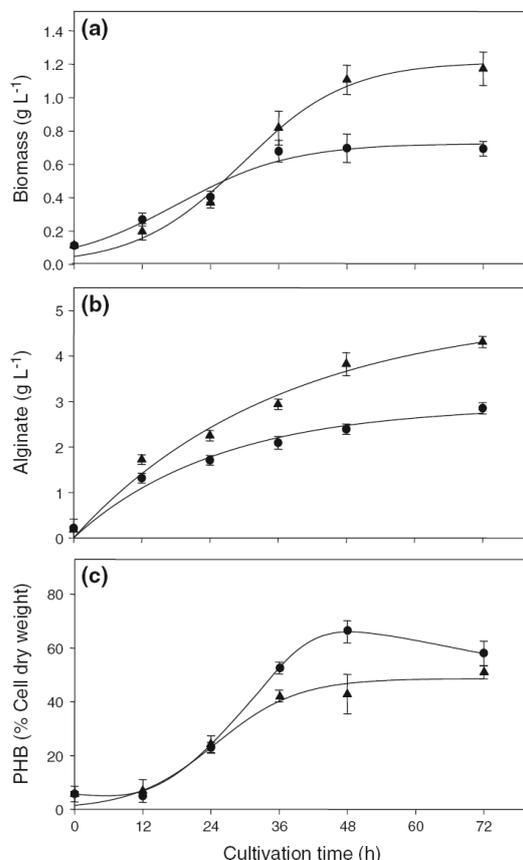


Fig. 2 Kinetic of biomass growth (a), alginate production (b), and PHB production (c) of the ATCN4 mutant cultured in BS minimal medium (filled circle) or rich media containing yeast extract (filled triangle)

Chemical characterisation of the alginate produced by the ATCN4 mutant

The rheological properties of bacterial alginate solutions are strongly influenced by the mean molecular mass, the degree of acetylation and the guluronic and mannuronic content of the polymer (Peña et al. 2007, 2011b). Therefore, these parameters were analysed for the alginate produced by the ATCN4 mutant strain cultivated in the minimal and rich media (Fig. 3).

The characteristics of the polysaccharide obtained under the two tested culture conditions varied considerably. As shown in Fig. 3a, the mutant ATCN4 strain grown in minimal medium showed an increased degree of acetylation from 0.5 to 5.2 % at the beginning of the culture (12–24 h). At 36 h, the acetyl content decreased slightly to 4.5 %, and it remained constant towards the end of the

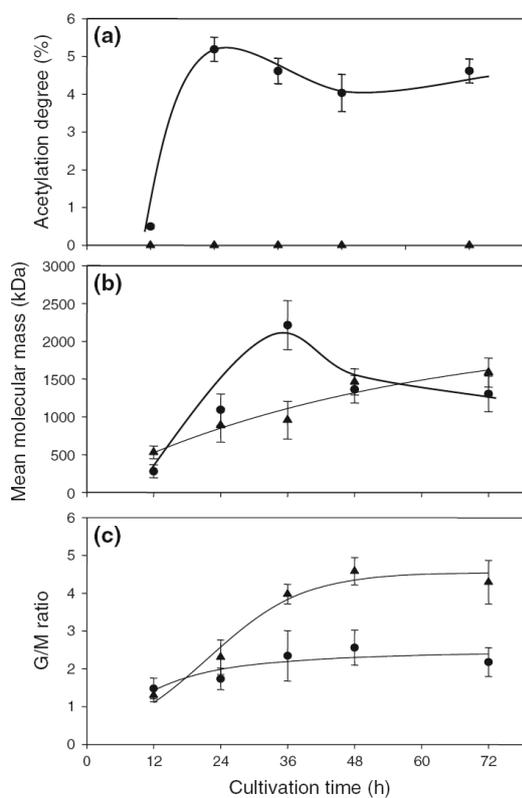


Fig. 3 The degree of acetylation (a), mean molecular mass (b), and G/M ratio (c) of the alginate isolated from cultures of the ATCN4 mutant in BS minimal medium (filled circle) or rich media containing yeast extract (filled triangle)

cultivation. In contrast, the alginate produced in the presence of the yeast extract was not acetylated.

The evolution of the mean molecular mass (MMM) of the alginate synthesised by the mutant ATCN4 under the two nutritional conditions evaluated is shown in Fig. 3b. In general, the trend observed for the values of the MMM of the polymers obtained from both conditions was similar, which was an initial MMM of approximately 500 kDa and a final MMM of approximately 1,300 kDa. However, an increased MMM of the alginate produced in the minimal medium of up to 2,200 kDa was observed after 36 h of cultivation.

The G/M ratio was also strongly affected by the nutritional conditions, as is shown in Fig. 3c. The alginate isolated from the cultures grown in minimal medium had a higher content of mannuronic acid and showed a G/M ratio of approximately 2 during the fermentation (Fig. 3c). In contrast, in the polymer obtained from the cultures containing yeast extract, the G/M ratio changed during the

fermentation. From 12 to 48 h, the G/M ratio increased from 1 to 4.5, which was constant towards the end of the cultivation (72 h).

Rheological behaviour of the alginate solutions

Figure 4 shows the consistency index (K) and the flow behaviour index (m) of the fermentation broths as a function of the alginate concentration under the two nutritional conditions tested. All the samples exhibited a pseudoplastic behaviour, which was characterised by a decrease in the apparent viscosity (η) when the shear rate ($\dot{\gamma}$) increased. Notably, a higher alginate concentration correlated with a higher consistency index (K) and a lower flow behaviour index (m) for the polymers obtained from the two conditions evaluated (Fig. 4a, b). However, the polymer produced in the minimal medium exhibited a higher consistency index (K) and a lower flow behaviour index (m) for the same alginate concentration with respect to that produced using the yeast extract in the culture medium.

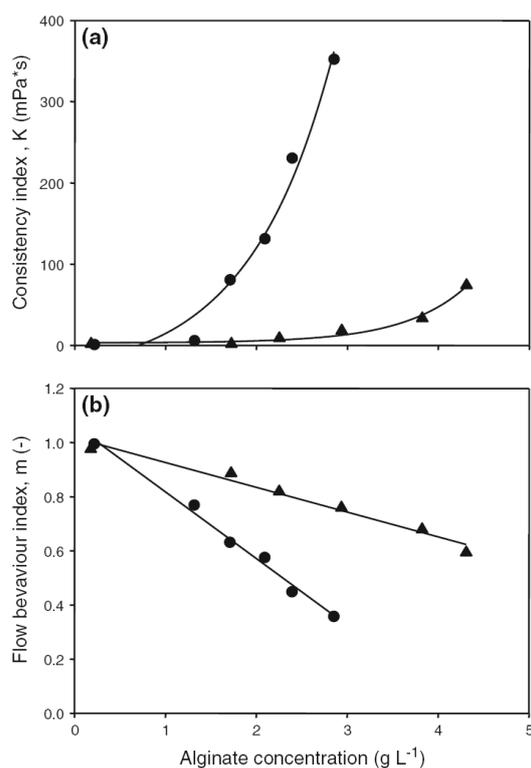


Fig. 4 The consistency index, K , (a) and flow behaviour index, m , (b) as a function of the alginate concentration in fermentation broths developed with the mutant ATCN4 in BS minimal medium (filled circle) or rich media containing yeast extract (filled triangle)

Springer

An important characteristic to define the mechanical properties of alginates is the complex shear modulus (G^*), which represents the total resistance of a sample to deformation or the stiffness of a viscoelastic material. Figure 5 shows the mechanical spectra of the alginate solutions (2 % w/v) derived from the ATCN4 cultures at 72 h. The mechanical properties (in terms of the G^* modulus) of the alginate solutions were higher in the polymers isolated from the cultures grown in the minimal medium. Thus, by comparing the G^* modulus at the same angular frequency of 10 rad/s (Fig. 5), a value of 6.4 Pa was obtained for the polymer extracted from the minimal medium, while a value of 3 Pa was determined for the alginate synthesised in the cultures with the yeast extract. Notably, a value of 0.16 Pa was calculated for an algal alginate (Sigma Aldrich) solution (2 % w/v) at 10 rad/s. This indicates that the solutions formed with alginate isolated from the minimal medium exhibited a higher rigidity than those prepared with alginate from conditions in which the yeast extract was used and that they were higher than the alginates currently in use in the hydrocolloid market (from marine algae).

Discussion

We have previously reported that in *A. vinelandii*, the absence of the Na⁺-NQR activity leads to an inability to maintain a transmembrane Na⁺ gradient and an increase in alginate production (Núñez et al. 2009). Although no

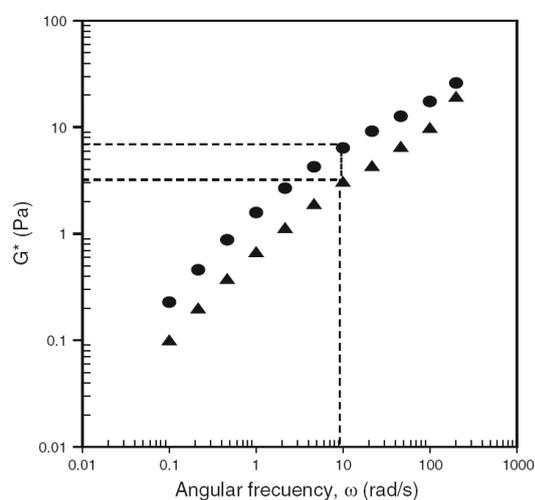


Fig. 5 Complex shear module (G^*) of the alginates obtained at 72 h from the cultures of the ATCN4 mutant in minimal medium (filled circle) or rich media containing yeast extract (filled triangle). An alginate concentration of 2 % (w/v) was used

conclusive explanation can be given, it is possible that the increase in alginate production in the ATCN4 mutant strain could be associated with a decrease in the overall NADH oxidase activity of this mutant or with the absence of the Na^+ transmembrane gradient (i.e., a defect in the cellular osmotic regulation). However, further studies will be necessary to elucidate the mechanism in detail.

In the present work, we found that not only was the biomass growth of a mutant lacking the Na^+ -NQR activity (ATCN4) increased but also the yield of alginate and PHB on sucrose by using the BS minimal medium (diazotrophic conditions). Diazotrophic growth of *A. vinelandii* in the presence of oxygen is possible because this bacterium uses a respiratory chain, which consists of the non-coupled NADH II (Bertsova et al. 2001) and the *bd*-type quinol oxidase that has a high oxygen consumption rate. This activity maintains low levels of intracellular oxygen, thus preventing the inactivation of the nitrogenase complex. However, the energy-conserving efficiency of this respiratory chain is five-fold lower than the respiratory chain that is used in the presence of fixed nitrogen (which uses the ATP-coupled NADH I) (Bertsova et al. 2001).

Although it has been shown that the NADH II complex is the main NADH oxidase enzyme in *A. vinelandii* under diazotrophic conditions, the elucidation of the role of the Na^+ -NQR complex in the respiratory chain and in the general metabolism of *A. vinelandii* ATCC 9046 needs to be investigated further. Improvements of the bacterial growth rate and alginate and PHB yields using a minimal medium in the ATCN4 mutant strain, compared to the wildtype strain, might be related to either an overall reduced NADH oxidase activity or to the lack of a Na^+ transmembrane gradient. It is possible to postulate that in the ATCN4 mutant strain, the low sucrose consumption rate could be the result of a diminished NADH oxidase activity caused by the absence of the Na^+ -NQR complex activity, which reduces the oxidation of sucrose through the TCA cycle and redirects the carbon source to a more efficient polymer synthesis and biomass production.

Changes in the properties of alginates can be useful for specific applications, especially in biomedical and biotechnology industries. Given the importance of alginate acetylation, we decided to measure the acetyl content in the polymers during the fermentation. As shown in Fig. 3a, the acetylation of the alginate was completely inhibited in the mutant ATCN4 strain grown in rich medium, which is a condition in which the wildtype ATCC 9046 strain produced an alginate with 3–5 % acetylation (Peña et al. 2011b); however, the alginate produced by the mutant ATCN4 strain in minimal medium was acetylated (up to 5 %) at a degree similar to or even higher than that of the alginate produced by the wildtype ATCC 9046 strain (3 %) (Castillo-Marengo et al. 2011).

The reason for the absence of acetyl groups in the alginate produced by the mutant ATCN4 strain in the presence of yeast extract remains unknown. However, it might be the result of a change in the environment of the periplasmic space, which affects the activity of the acetylase complex. Whether this change is linked to the absence of the Na^+ transmembrane gradient or to any other effect associated with the absence of the Na^+ -NQR activity needs to be investigated.

Alginate acetylation occurs in the cellular periplasmic space via the action of an acetylase, which uses acetyl-CoA as the source for the acetyl groups (Vázquez et al. 1999). Therefore, the degree of acetylation of the alginate may reflect the acetyl-CoA availability and/or the activity of the acetylase. Previous studies by our group (Peña et al. 2006) have shown that an increase in the concentration of MOPS (a component used in the medium to regulate the pH) increased the acetyl content of the alginate synthesised by two-fold and the acetylase activity by 50 % in cultures of *A. vinelandii* (ATCC 9046 strain). We have proposed that MOPS could contribute to a better control of the periplasmic pH, which might enhance the acetylase activity (Peña et al. 2006). It is possible that in the cultures of the mutant ATCN4 strain grown in BS medium supplemented with yeast extract, the absence of a transmembrane sodium gradient might have promoted a change in the periplasmic ionic environment, which in turn inhibited the activity of the acetylase complex.

Our results have shown for the first time that by using the mutant ATCN4 strain, the nutritional conditions importantly determine the acetyl content of the alginate and, in turn, the physicochemical properties of the polymer. This is not the case for the wildtype ATCC 9046 strain, which produces an alginate with a similar degree of acetylation under the two conditions evaluated (Castillo-Marengo et al. 2011; Peña et al. 2011b). Although it is known that the degree of acetylation may be critical for determining the rheological behaviour of alginate solutions (Skjåk-Bræk et al. 1986, 1989), there is only one study (Peña et al. 2006) documenting the influence of the medium components on the acetyl content and on the rheological characteristics of alginate solutions obtained by the cultivation of *A. vinelandii*. The specific acetylation of alginate through the manipulation of the nutritional conditions in the culture medium (not a post-fermentative step) is a suitable method for improving the alginate properties and to expand the potential applications of this polysaccharide.

The mean molecular mass of the alginate determines the viscosity and the thickening properties of the polymer. Figure 3b shows that, in general, the evolution of the mean molecular mass of the alginate produced by the ATCN4 strain was similar under both culture conditions tested. In

the cultures grown in minimal medium, a maximal molecular mass of the alginate of $2,200 \pm 275$ kDa was reached after 36 h of cultivation. After 36 h, a decrease in the mean molecular mass of the alginate isolated from the cultures using minimal medium was observed. Because *A. vinelandii* produces alginate-degrading enzymes (Trujillo-Roldán et al. 2004; Gimmestad et al. 2009), it is possible that the decrease in the mean molecular mass of the alginate is due to the action of alginases, which degrade the polymer in the final stages of cultivation.

As shown in Fig. 3c, the mannuronic content in the alginate isolated from the ATCN4 mutant strain cultured in the BS minimal medium was higher with respect to that obtained from cultures supplemented with yeast extract. These results are in line with the hypothesis related to the steric protection mechanism provided by the acetyl groups to the alginate (Skjåk-Bræk et al. 1986; Valla et al. 2001). According to these authors, the acetyl groups are present only at mannuronic residues of the alginate, and they function as a steric barrier that blocks the action of the epimerases, which carry out the transformation of mannuronic to guluronic acid. Therefore, it is expected that the mannuronic residues of an alginate with a higher degree of acetylation are less epimerised, and, consequently, the amount of guluronic residues will be lower, as shown for the alginate produced in the BS minimal medium (Fig. 3c).

From an application point of view, one of the most important characteristics of alginate is the rheological behaviour of its solutions (Clementi et al. 1998; Peña et al. 2000). As is shown in Fig. 4, the rheological parameters of the alginate are strongly influenced by the nutritional conditions of the culture under equal alginate concentrations. The consistency index (*K*) was higher and the flow index (*m*) was lower in the alginates produced in the minimal media cultures. It is known that both parameters are influenced by the molecular mass distribution (Martinsen et al. 1991) and by the degree of acetylation of the polymer (Skjåk-Bræk et al. 1989). Because the mean molecular mass and the molecular mass distribution (data not shown) were similar during a majority of the culturing for the two conditions tested, it is possible to infer that the differences in the rheology of the alginate in the fermentation broths was due to the clear difference in the alginate acetylation.

Another important rheological parameter is the G^* modulus. As shown in Fig. 5, higher values of G^* modulus were determined for the alginate produced in the minimal medium. Several authors (Moresi et al. 2001, 2004; Mancini et al. 2006; Draget and Taylor 2011) have reported that there is a direct relationship between the G/M ratio and the mechanical properties of the alginate. In general, it has been reported that alginates with a high G/M ratio form strong and brittle gels, while alginates with a low G/M ratio

Table 2 Complex modulus of alginate solutions from different sources

| Source | G^* (Pa) ^a |
|--------------------------------|-------------------------|
| Algal alginate (Sigma Aldrich) | 0.16 |
| ATCN4 (Rich medium) | 3 |
| ATCN4 (Minimal medium) | 6.4 |

Alginate solutions were prepared at a concentration of 2% (20 mg mL⁻¹)

^a The dynamic results are for an angular frequency of 10 rad s⁻¹

form weaker and softer, but more elastic, gels (Skjåk-Bræk et al. 1986). In our study, the value of the G^* modulus seems to not be as directly influenced by the G/M ratio as alginates with a higher guluronic content, such as those obtained from the cultures in which the yeast extract was employed (Fig. 5), which exhibited a lower value of the G^* module compared to the polymer extracted from the cultures in the minimal medium (Fig. 5). One possible explanation for this behaviour is provided by the work of Geddie and Sutherland (1994), who found that the formation of the “egg box” structure requires cooperative associations of contiguous sequences larger than 20 G blocks and that the presence of MG sequences in the chain contributes to the formation of soft gels. This indicates that the strength of a gel is not determined solely by the G/M ratio but also requires the presence of homopolymeric G sequences.

Finally, an analysis of the mechanical properties of algal alginate, in comparison to the alginates produced by the mutant ATCN4 strain, was carried out. Alginates derived from the cultures of the ATCN4 strain were 20 and 40 times more rigid for polymers produced in cultures grown in minimal medium (6.4 Pa) and using yeast extract (3.0 Pa) conditions, respectively, compared to the value measured in the commercial algal alginate (0.16 Pa) (Table 2).

Overall, our results have shown that the culture of ATCN4 mutant in minimal medium promoted the synthesis of a polymer with improved rheological quality in terms of its mechanical properties, compared to the alginate produced in cultures in which the yeast extract was supplemented. From a technological point of view, the use of a mutant strain, such as ATCN4, together with the control of the nutritional conditions could be a suitable strategy to produce alginates with rheological properties that match (or even improve upon) those of the alginates currently used in the hydrocolloid market (from marine algae).

Acknowledgments We thank Arturo Ocádiz for his excellent technical support. This research was supported by project CONACYT (131851) and project PAPIIT (IN214208) from the Universidad Nacional Autónoma de México.

References

- Bertsova YV, Bogachev AV, Skulachev VP (2001) Noncoupled NADH: ubiquinone oxidoreductase of *Azotobacter vinelandii* is required for diazotrophic growth at high oxygen concentrations. *J Bacteriol* 183:6869–6874
- Castillo-Marengo T, Galindo E, Peña C (2011) Specific growth rate determines alginate acetylation and poly- β -hydroxybutyrate synthesis in *Azotobacter vinelandii*: Studies on chemostat cultures under constant dissolved oxygen tension. In: 1st European Congress of Applied Biotechnology, Sept 25–29 Berlin, Germany
- Clementi F (1997) Alginate production by *Azotobacter vinelandii*. *Crit Rev Biotechnol* 17:327–361
- Clementi F, Mancini M, Moresi M (1998) Rheology of alginate from *Azotobacter vinelandii* in aqueous dispersions. *J Food Eng* 36:51–62
- Díaz-Barrera, Soto E (2010) Biotechnological uses of *Azotobacter vinelandii*: current state, limits and prospects. *Afr J Biotechnol* 9(33):5240–5250
- Díaz-Barrera A, Peña C, Galindo E (2007) The oxygen transfer rate influences the molecular mass of the alginate produced by *Azotobacter vinelandii*. *Appl Microbiol Biotechnol* 76:903–910
- Draget I, Taylor C (2011) Chemical, physical and biological properties of alginates and their biomedical implications. *Food Hydroc* 25:251–256
- Galindo E, Peña C, Núñez C, Segura D, Espín G (2007) Molecular and bioengineering strategies to improve alginate and polyhydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii*. *Microbiol Cell Fact* 6:1–16
- Geddie J, Sutherland I (1994) The effect of acetylation on cation binding by algal and bacterial alginates. *Biotechnol Appl Biochem* 20:117–129
- Gimmestad M, Ertesvag H, Heggeset T, Aarstad O, Svanem B, Valla S (2009) Characterization of three new *Azotobacter vinelandii* alginate lyases, one of which is involved in cyst germination. *J Bacteriol* 191:4845–4853
- Hayashi M, Hirai K, Unemoto T (1995) Sequencing and the alignment of structural genes in the *nqr* operon encoding the Na⁺-translocating NADH:quinone reductase from *Vibrio alginolyticus*. *FEBS Lett* 363:75–77
- Hernández R, Orive G, Murua A, Pedraz J (2010) Microcapsules and microcarriers for in situ cell delivery. *Adv Drug Del Rev* 62(7–8):711–730
- Karr D, Waters J, Emerich D (1983) Analysis of poly- β -hydroxybutyrate in *Rhizobium japonicum* bacteroids by ion-exclusion high-pressure liquid chromatography and UV detection. *Appl Environ Microbiol* 46:1339–1344
- Klimek J, Ollis D (1980) Extracellular microbial polysaccharides: kinetics of *Pseudomonas sp.*; *Azotobacter vinelandii*, and *Aureobasidium pullulans* batch fermentations. *Biotechnol Bioeng* 22:2321–2342
- Knutson C, Jeanes A (1968) Determination of the composition of uronic acid mixtures. *Anal Biochem* 24:482–490
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall R (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275
- Mancini M, Moresi M, Sappino F (2006) Rheological behaviour of aqueous solutions and dispersions of algal sodium alginates. *J Food Eng* 28:283–295
- Martinsen A, Skjåk-Braek G, Smidsrod O, Zanetti F, Paoletti S (1991) Comparison of different methods for determination of molecular weight and molecular weight distributions of alginates. *Carbohydr Polym* 15:171–193
- Mejía MA, Segura D, Espín G, Galindo E, Peña C (2010) Two-stage fermentation process for alginate production by *Azotobacter vinelandii* mutant altered in poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) synthesis. *J Appl Microbiol* 108(1):55–61
- Miller G (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal Chem* 31:426–428
- Moresi M, Mancini M, Bruno M, Rancini R (2001) Viscoelastic properties of alginate gels by oscillatory dynamic tests. *J Texture Stud* 32:375–396
- Moresi M, Bruno M, Parente E (2004) Viscoelastic properties of microbial alginate gels by oscillatory dynamic tests. *J Food Eng* 64:179–186
- Nakayama Y, Hayashi M, Unemoto T (1998) Identification of six subunits constituting Na⁺-translocating NADH: quinone reductase from the marine *Vibrio alginolyticus*. *FEBS Lett* 422:240–242
- Núñez C, Bogachev AV, Guzmán G, Tello I, Guzmán J, Espín G (2009) The Na⁺-translocating NADH: ubiquinone oxidoreductase of *Azotobacter vinelandii* negatively regulates alginate synthesis. *Microbiology* 155:249–256
- Peña C, Campos N, Galindo E (1997) Changes in alginate molecular mass distribution, broth viscosity and morphology of *Azotobacter vinelandii* cultured in shake flasks. *Appl Microbiol Biotechnol* 48:510–515
- Peña C, Trujillo-Roldán M, Galindo E (2000) Influence of dissolved oxygen tension and agitation speed on alginate production and its molecular weight in cultures of *Azotobacter vinelandii*. *Enzyme Microb Technol* 27:390–398
- Peña C, Miranda L, Segura D, Núñez C, Espín G, Galindo E (2002) Alginate production by *Azotobacter vinelandii* mutants altered in poly-beta-hydroxybutyrate and alginate biosynthesis. *J Ind Microbiol Biotechnol* 29(5):209–213
- Peña C, Hernández L, Galindo E (2006) Manipulation of the acetylation degree of *Azotobacter vinelandii* alginate by supplementing the culture medium with 3-(N-morpholino)-propane-sulfonic acid. *Lett Appl Microbiol* 43:200–204
- Peña C, Peter C, Büchs J, Galindo E (2007) Evolution of the specific power consumption and oxygen transfer rate in alginate-producing cultures of *Azotobacter vinelandii* conducted in shake flasks. *Biochem Eng J* 36:73–80
- Peña C, Núñez C, Castillo-Marengo T, Segura D (2011a) Bioprocess design: fermentation strategies for improving the production of alginate and poly- β -hydroxybutyrate (PHB) by *Azotobacter vinelandii*. In: Bioengineering, Ed. Angelo Carpi, Intech Open Access Publisher ISBN: 978-953-307-268-5, pp 217–242
- Peña C, Galindo E, Büchs J (2011b) The viscosifying power, degree acetylation and molecular mass of the alginate produced by *Azotobacter vinelandii* in shake flasks are determined by the oxygen transfer rate. *Proc Biochem* 46:290–297
- Rich PR, Meunier B, Ward FB (1995) Predicted structure and possible ionmotive mechanism of the sodium-linked NADH: ubiquinone oxidoreductase of *Vibrio alginolyticus*. *FEBS Lett* 375:5–10
- 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, Guzmán J, Espín G (2003) *Azotobacter vinelandii* mutants that overproduce poly-beta-hydroxybutyrate or alginate. *Appl Microbiol Biotechnol* 63(2):159–163
- Skjåk-Braek G, Grasdalen H, Larsen B (1986) Monomer sequence and acetylation pattern in some bacterial alginates. *Carbohydr Res* 154:239–250
- Skjåk-Braek G, Grasdalen H, Smidsrod O (1989) Inhomogeneous polysaccharide ionic gels. *Carbohydr Polym* 10:31–54
- Skulachev VP (1989) The sodium cycle: a novel type of bacterial energetics. *J Bioenerg Biomembr* 21:635–647
- Trujillo-Roldán MA, Moreno S, Segura D, Galindo E, Espín G (2003) Alginate production by an *Azotobacter vinelandii* mutant unable

- to produce alginate lyase. *Appl Microbiol Biotechnol* 60: 733–737
- 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
- Valla S, Li J, Ertesvåg H, Barbeyron T, Lindahl U (2001) Hexuronyl C5-epimerases in alginate and glycosaminoglycan biosynthesis. *Biochimie* 83:819–830
- Vázquez A, Moreno S, Guzmán J, Alvarado A, Espín G (1999) Transcriptional organization of the *Azotobacter vinelandii* algGXLVIFA genes: characterization of *algF* mutants. *Gene* 232:217–222
- Zapata-Vélez A, Trujillo-Roldán M (2010) The lack of a nitrogen source and/or the C/N ratio affects the molecular weight of alginate and its productivity in submerged cultures of *Azotobacter vinelandii*. *Ann Microbiology* 60:661–668