



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**EXPRESIÓN DE GENES INVOLUCRADOS EN LA POLIMERIZACIÓN
DEL ALGINATO Y ACTIVIDAD ALGINASA EN FUNCIÓN DEL
OXÍGENO DISUELTTO Y SU RELACIÓN CON EL PESO MOLECULAR
DEL ALGINATO PRODUCIDO POR *Azotobacter vinelandii***

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

CELIA FLORES OCAMPO

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. ENRIQUE GALINDO FENTANES

INTEGRANTES DE COMITÉ TUTOR:

Dra. CINTHIA E. NUÑEZ LÓPEZ, IBT/UNAM

Dr. MIGUEL ÁNGEL CEVALLOS GAOS CCG/UNAM



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente proyecto se realizó en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. Enrique Galindo Fentanes.

Durante la realización de este proyecto se contó con el apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través del proyecto 131851 y del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la Universidad Nacional Autónoma de México, a través del proyecto IT-100513.

A los amores que me fortalecen e inspiran:

Jorge, Jorge André y Axel Iván.

A mis padres

Y a través del tiempo y el espacio..... a mis suegros[†]

AGRADECIMIENTOS

Mi más profundo y sincero agradecimiento al **Dr. Enrique Galindo Fentanes**, cuyo apoyo ha sido fundamental para realizar y culminar esta meta. Por el orgullo de formar parte de su grupo de trabajo. Estoy convencida de que no puede haber un mejor guía y jefe.

Al **Dr. Carlos Peña Malacara**, por su importante contribución y apoyo en el desarrollo del proyecto. Sin duda la discusión constante lo enriquecieron importantemente.

A los miembros del comité tutorial: **Dra. Cinthia E. Nuñez López** y **Dr. Miguel Ángel Cevallos Gaos**, por sus valiosas discusiones y aportaciones al proyecto.

Al **Dr. Leobardo Serrano**, por las muy interesantes discusiones y sugerencias al proyecto.

A la **Biól. Soledad Moreno** por el apoyo técnico y entrenamiento en los análisis de PCR en tiempo real.

Al **Biól. Mario Alberto Caro Bermúdez** por el apoyo técnico en el mantenimiento del biorreactor, por su siempre eficiente, dispuesta e incondicional ayuda, que sin duda, acortaron los tiempos de espera.

Al **Ing. Dusstthon Llorent** por el apoyo y asesoría técnica en los sistemas de control del biorreactor.

A la **Dra. Tania Castillo Marengo** por el apoyo y las discusiones realizadas al proyecto. Por ser una agradable compañía a lo largo de estos años, y por ser amiga.

A los integrantes del proyecto alginatos, a los que están y a los que han emigrado, por el apoyo brindado en todo momento.

A todos los integrantes del grupo Galindo, que no especifico por evitar alguna omisión, pero me es importante expresar mi gratitud por el apoyo y la espera que en algún momento tuvo que ser.

A todos, mi mayor agradecimiento.

INDICE GENERAL	PÁGINA
Resumen	1
Abstract	3
Capítulo 1: Introducción	5
Capítulo 2: Antecedentes	7
2.1. El alginato: estructura, características y fuentes de obtención	7
2.1.1. El peso molecular del alginato y su importancia	7
2.2. <i>Azotobacter vinelandii</i> : características y ventajas como productora de alginato	9
2.3. Biosíntesis del alginato	10
2.3.1. Polimerización del alginato: El complejo alginato polimerasa y alginasas de <i>Azotobacter vinelandii</i> y su participación en la polimerización del alginato.	10
2.3.1.1. Características de las polimerasas Alg8 y Alg44	12
2.3.1.2. Papel de las alginasas en la determinación del PM	14
2.3.1.3. Especificidad y características de las alginasas de <i>A. vinelandii</i>	15
2.3.2. Modificación del alginato (acetilación y epimerización y depolimerización)	16
2.3.3. Genética de la biosíntesis de alginato en <i>A. vinelandii</i>	17
2.4. Parámetros de proceso que influyen en la biosíntesis y en el PM del alginato producido por <i>A. vinelandii</i> .	19
2.4.1. Influencia del oxígeno sobre el metabolismo de <i>A. vinelandii</i>	19
2.4.2. Factores involucrados en la determinación el PM del alginato en <i>A. vinelandii</i>	20
2.5. Transcripción de <i>alg8</i> y <i>algL</i> y su relación con el PM del alginato	21
Capítulo 3: Objetivos	24
Capítulo 4: Estrategia experimental	25
Capítulo 5: Materiales y métodos	26
5.1 Cepa	26
5.2 Medio de cultivo	26
5.3 Desarrollo de los cultivos en biorreactor de 3L	27
5.3.1. Preparación del inóculo	27
5.3.2. Descripción del biorreactor y las condiciones de operación	27
5.4 Métodos analíticos	28
5.4.1 Cuantificación de Biomasa	28

5.4.2	Cuantificación de alginato	28
5.4.3	Cuantificación de proteína	28
5.4.4	Cuantificación de sacarosa residual	28
5.4.5	Determinación del peso molecular promedio del alginato	28
5.4.6	Cuantificación de polihidroxitirato	28
5.4.7	Cuantificación de amonio	28
5.4.8	Actividad alginasa extracelular	29
5.4.9	Actividad alginasa intracelular	29
5.4.10	Cuantificación de CO ₂ en el gas efluente del reactor	29
5.4.11	Velocidad de transferencia de oxígeno y consumo específico de oxígeno	29
5.4.12.	Análisis de transcripción génica mediante PCR en tiempo real	30
Capítulo 6: Resultados y Discusión		32
6.1	Crecimiento y producción de alginato y PHB durante el cultivo de <i>A. vinelandii</i> a TOD's de 1 % y 5 %.	32
6.1.1.	Control de la TOD en los cultivos	32
6.1.2.	Crecimiento celular, producción de alginato y PHB	32
6.1.3	Consumo de oxígeno y producción de CO ₂ en cultivos de <i>A. vinelandii</i> a TOD de 1 y 5 %.	35
6.2	Peso molecular promedio del alginato en función de la tensión de oxígeno disuelto.	38
6.3.	Expresión de genes que codifican para proteínas constituyentes del complejo alginato polimerasa y para alginasas, en función del oxígeno disuelto.	41
6.3.1	Expresión relativa de genes constituyentes del complejo alginato polimerasa.	41
6.3.2	Expresión relativa de genes que codifican para alginasas.	43
6.4.	Actividad alginasa en función de la TOD en cultivos de <i>A. vinelandii</i> desarrollados a 1 % y 5 % de TOD.	46
Capítulo 7: Conclusiones		50
Capítulo 8: Perspectivas		51
Capítulo 9: Productos generados		52
Capítulo 10: Bibliografía		53
Anexo 1:	Artículo publicado	59
Anexo 2:	Métodos analíticos.	67

INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
2.1. Estructura química del alginato bacteriano.	8
2.2. Modelo propuesto para la polimerización, acetilación y exportación del alginato en células de <i>A. vinelandii</i> .	11
2.3. Organización de los genes biosintéticos del alginato en <i>A. vinelandii</i> .	18
6.1. Perfiles de la tensión de oxígeno disuelto a 1 y 5 %, durante el proceso de producción de alginato por <i>A. vinelandii</i> .	33
6.2. Crecimiento celular como contenido de proteína (a), producción de polihidroxibutirato (b), producción de alginato (c) y consumo de sustrato (d) en cultivos de <i>A. vinelandii</i> a 1 y 5 % de TOD	34
6.3. Producción de CO ₂ (cuantificado en el venteo del biorreactor) en cultivos de <i>A. vinelandii</i> cultivada a TODs de 1 y 5 %	36
6.4. Peso molecular promedio (a) y producción de alginato (b) por <i>A. vinelandii</i> cultivada a 1 y 5 % de TOD y a condiciones controladas de temperatura (29°C), pH (7.2) y agitación (500 rpm).	39
6.5. Distribución de los pesos moleculares e índice de polidispersión del alginato producido por <i>A. vinelandii</i> en función de la TOD y del tiempo de cultivo.	40
6.6. Expresión relativa de <i>alg8</i> , <i>alg44</i> y <i>algX</i> en fase exponencial (a) y en fase estacionaria (b) de crecimiento de <i>A. vinelandii</i> cultivada a tensiones de oxígeno disuelto de 1 % y 5 %.	42
6.7. Representación de los dominios presentes en MucR de <i>P. aeruginosa</i> y del modelo propuesto para la regulación de Alg44 en función del oxígeno disuelto en <i>A. vinelandii</i> .	44
6.8. Expresión de genes que codifican para alginasas en <i>A. vinelandii</i> , en función de la TOD del cultivo en fase exponencial y en fase estacionaria .	45
6.9. Actividad alginasa intracelular (a) y extracelular (b) en cultivos de <i>A. vinelandii</i> desarrollados a 1 y 5 % de TOD y agitación constante de 500 rpm.	47
6.10. Evolución del PM (a) del alginato sintetizado por cepas de <i>A. vinelandii</i> (SML2 y ATCC 9046) y actividad alginasa extracelular (b) en cultivos desarrollados a 3 % de TOD.	49

INDICE DE TABLAS

Tabla	Página
2.1. Alginasas de <i>A. vinelandii</i> : Localización y características.	16
2.2. Aspectos involucrados en la polimerización del alginato producido por <i>A. vinelandii</i> : comparación entre los ya estudiados y los que requieren estudiarse.	22
5.1. Composición del Medio Burk Modificado.	26
5.2. Primers utilizados para los análisis de PCR en tiempo real.	31
6.1. Parámetros cinéticos de los cultivos, en función del oxígeno disuelto.	35
6.2. Velocidad de consumo de oxígeno, velocidad específica de consumo de oxígeno y coeficiente respiratorio en cultivos de <i>A. vinelandii</i> desarrollados a 1 y 5 % de TOD.	38

RESUMEN

Los alginatos son copolímeros lineales utilizados como agentes espesantes, gelificantes, estabilizantes de espumas y emulsiones, en la microencapsulación de células y preparación de biocatalizadores. El peso molecular (PM) del alginato determina la capacidad viscosificante y gelificante del polímero en suspensión. A pesar de lo anterior, la etapa de polimerización en la biosíntesis del alginato por *Azotobacter vinelandii* ha sido poco estudiada.

El PM del alginato es el resultado final del proceso de polimerización. En este proceso, en cultivos de *A. vinelandii* están involucradas dos actividades enzimáticas: una actividad polimerasa atribuida a las proteínas Alg8 y Alg44; y una actividad alginasa (que depolimeriza el alginato) presente a nivel intra y extracelular. En el genoma de *A. vinelandii* se han caracterizado tres alginasas periplásmicas (AlgL, AlyA1 y AlyA2) y dos que son excretadas al ambiente extracelular (AlyA3 y AlgE7).

El oxígeno disuelto, medido como la tensión de oxígeno disuelto (TOD), determina el peso molecular del alginato en cultivos de *Azotobacter* spp. Sin embargo, hasta antes de este proyecto no se habían elucidado las respuestas fisiológicas a través de las cuales, el oxígeno determina el peso molecular del alginato. Existen en la literatura dos estudios en los que se ha analizado la expresión de sólo dos de los genes (*alg8* y *algL*) que participan en la edición del PM del alginato. Se ha observado un incremento en la expresión de *alg8* cuando se produce alginato de alto peso molecular y una disminución en su expresión, cuando el PM es más bajo. Sin embargo, en el caso de *algL* (que codifica para una alginasa periplásmica) la relación entre el incremento en su expresión y la disminución del PM (depolimerización) no es clara.

En este proyecto se llevó a cabo, por primera vez, un análisis de los factores que intervienen en la polimerización del alginato. Se estudió la expresión relativa de todos los genes cuyos productos participan en la determinación del peso molecular del alginato, incluyendo tanto a los genes que codifican para el complejo alginato polimerasa (*alg8* y *alg44*) como a todos los genes que codifican para alginasas (*algL*, *alyA1*, *alyA2*, *alyA3* y *algE7*) en función del oxígeno disuelto (en cultivos desarrollados a 1 y 5 % de TOD). Además, considerando que el polímero debe transportarse por el periplasma para su posterior excreción al ambiente extracelular, se incluyó el análisis de *algX*, cuyo producto participa en el transporte y protección del polímero en el espacio periplásmico. Se analizó también la actividad alginasa (tanto intra como extracelular) durante todo el proceso de fermentación.

La biosíntesis de alginato de alto peso molecular (1200 kDa, en cultivos desarrollados a 1 % de TOD), respecto al obtenido en cultivos a 5 % de TOD (42 kDa), está asociada a un incremento de

6.8 y 4 veces en la expresión de los genes constituyentes del complejo alginato polimerasa, *alg8* y *alg44*, respectivamente, en fase exponencial; y de 3 y 4 veces, respectivamente, en fase estacionaria, con respecto de la expresión relativa de estos genes en cultivos a 5 % de TOD y comparados en las mismas fases de crecimiento. En el caso de *algX*, su expresión relativa se incrementó en cultivos a baja TOD, cuando se produce alginato de alto PM, (en 6.9 y 3.5 veces, en fase exponencial y fase estacionaria, respectivamente), comparados con su expresión relativa en las mismas fases de los cultivos desarrollados a 5 % de TOD.

El oxígeno disuelto modificó tanto la transcripción de genes que codifican para alginasas como la actividad alginasa extracelular. En general, la expresión relativa de los genes codificantes para alginasas fue mayor en cultivos a 1 % de TOD. Sin embargo, la actividad alginasa extracelular fue mayor en los cultivos a 5 % de TOD, respecto de la cuantificada en los cultivos desarrollados a 1 % de TOD. La actividad alginasa intracelular fue similar en ambas condiciones de TOD. Estos resultados sugieren una regulación postranscripcional de los genes que codifican para alginasas.

Desde el inicio de la producción de alginato (18 h), el PM del polímero fue significativamente diferente en las dos condiciones de TOD evaluadas. Sin embargo, la actividad alginasa intracelular y extracelular en ese periodo (hasta las 18 h), fueron similares (menores a 0.015 U/mg_{proteína}), independientemente de la TOD del cultivo. Sólo la actividad alginasa extracelular fue mayor (0.05 U/mg_{proteína}) en la fase estacionaria de los cultivos desarrollados a 5 % de TOD; respecto de la cuantificada en el cultivo a 1 % de TOD. Sin embargo, ese incremento no explica las diferencias en el PM del polímero, observadas desde el inicio del proceso de producción del alginato (18 h). Lo anterior sugiere que la actividad alginasa extracelular no influye significativamente en la determinación del peso molecular del polímero y, por lo tanto, los cambios en el PM del polímero estarían determinados por la actividad del complejo alginato polimerasa.

ABSTRACT

Alginates are copolymers used as stabilizing, thickening, gel- or film-forming agent of foams and emulsions, in the cell microencapsulation and in the preparation of biocatalysts. The alginate molecular weight (MW) determines the viscosifying and gelling ability of the polymer in suspension. However, polymerization is the less studied step in alginate biosynthesis by *Azotobacter vinelandii*.

The alginate MW is the result of the polymerization process, in which, in *A. vinelandii* cultures, are involved two enzymatic activities: a polymerase activity due to the proteins Alg8 and Alg44; and an alginase activity (that depolymerizes alginate) present at intra and extracellular level. In the *A. vinelandii* genome three periplasmic alginases (AlgL, AlyA1, and AlyA2) and two alginases that are secreted into the extracellular environment (AlyA3 and AlgE7) have been characterized.

The dissolved oxygen tension (DOT) determines the alginate MW in *A. vinelandii* cultures. However, the physiological responses of the bacterium to the oxygen through which DOT determines the molecular weight had not been studied. In the literature, there are two studies which have analyzed the relative expression of only two of the genes (*alg8* and *algL*), involved in determining alginate MW. When high MW alginates were produced, an increase in *alg8* gene expression was observed. On the contrary, when alginate with a low MW was produced, *alg8* gene expression was low. However, in the *algL* expression (whose product is an intracellular alginase) the relationship between the increase of its expression with the decrease of the alginate MW was not clear. In this study, an analysis of the factors involved in alginate polymerization, identifying the mechanism by which the oxygen determines the polymer molecular weight, was conducted.

The relative expression of all genes involved in the determination of the alginate molecular weight, including genes coding for the alginate polymerase complex (*alg8* y *alg44*) and genes encoding alginases (*algL*, *alyA1*, *alyA2*, *alyA3*, and *algE7*) as a function of DOT (in cultures developed at 1 and 5 % DOT), was studied. In addition, considering that alginate should be transported through the periplasm, in order to subsequently be secreted to the extracellular environment, the transcription of *algX*, whose product participates in the transport and polymer protection, was analyzed. Also, the alginase activity (both intracellular as extracellular) was evaluated during the fermentation process.

The biosynthesis of alginate with a high molecular weight (1200 kDa, in cultures developed at 1 % DOT) with respect to that obtained in cultures conducted at 5 % DOT (42 kDa), was associated with an increase in the relative expression of genes of the alginate polymerase complex (*alg8* and

alg44) of 6.8 and 4 fold, respectively, in exponential phase; and 3 and 4 fold, respectively, in stationary phase, with respect to the relative expression of these genes in cultures conducted at 5 % of DOT and compared in the same growth phase. For *algX*, its relative expression was increased in cultures at low DOT (where alginate with a high molecular weight is produced), 6.9 and 3.5 fold (in exponential and stationary phase, respectively), compared with its relative expression in the same phases of cultures carried out at 5 % DOT.

The DOT modified the relative transcription of genes encoding for alginases and the extracellular alginase activity. In general, the relative expression of them was higher in cultures at 1 % of DOT. However, an opposite effect on the extracellular alginase activity was observed, which was 5 fold higher in cultures developed at 5 % of DOT, with respect to the one quantified in cultures developed at 1 % of DOT. The differences between alginases transcription and alginase activity found in the present study, could be explained by a postranscriptional regulation.

From the beginning of the alginate production process (18 h), the polymer MW was significantly different (560 and 42 kDa for cultures at 1 % and 5% of DOT, respectively) as a function of the DOT. However, the intracellular and extracellular alginase activity in that time (18 h), were similar, independently of the DOT condition evaluated. Only the extracellular alginase activity was higher (0.05 U/mg_{protein}) in the stationary phase of the cultures conducted at 5 % DOT with respect to the measured in cultures at 1 % of DOT; however, this increase did not explain the differences in the polymer MW observed at the beginning of the alginate production process (18 h). The above suggests that the extracellular alginase activity did not significantly influence the alginate molecular weight, and therefore, the changes in the alginate MW would be determined by the activity of the alginate polymerase complex.

CAPITULO 1

INTRODUCCION

El alginato es un copolímero lineal, constituido por dos monómeros, el ácido β -D-manurónico (M) y el ácido α -L-gulurónico (G). El polímero tiene importantes aplicaciones en diferentes sectores industriales. Recientemente se ha destacado su uso en el área biomédica debido a sus características inmunológicas, biocompatibles y biodegradables (Sun y Tan 2013; Lee and Mooney, 2012), lo que ha motivado el desarrollo de procesos de optimización en su producción y en su calidad (Sabra y Zeng, 2009). El alginato comercial es extraído de algas, sin embargo, su producción por fuentes bacterianas como *Azotobacter vinelandii* presenta ventajas importantes como el control de los parámetros de proceso durante su producción, lo que permite el control de la composición química del alginato, además de la reproducibilidad de los procesos.

La producción de alginato por *A. vinelandii* ha sido ampliamente estudiada, destacando la influencia de parámetros de proceso sobre la producción volumétrica del polímero (Clementi, 1997; Galindo *et al.*, 2007; Peña *et al.*, 2011). Entre los parámetros estudiados, destaca el papel de oxígeno disuelto, medido como Tensión de Oxígeno Disuelto (TOD) en el cultivo. La TOD utilizada en el proceso de producción determina el PM del polímero (Parente *et al.*, 1998; Sabra *et al.*, 1999; Parente *et al.*, 2000; Peña *et al.*, 2000; Trujillo-Roldán *et al.*, 2004). Sin embargo, no se ha analizado cuáles son las respuestas fisiológicas o moleculares que el oxígeno modifica y a través de las cuales, determina el peso molecular del alginato. Existen en la literatura datos que indican que el PM del alginato es determinado por la actividad del complejo alginato polimerasa, el cual está constituido por dos subunidades (Alg8 y Alg44); y por varias alginasas, que depolimerizan el alginato, disminuyendo su PM. Las alginasas son tres periplásmicas (AlgL, AlyA1 y AlyA2) y dos que son excretadas al ambiente extracelular (AlyA3 y AlgE7) (Setubal *et al.*, 2009).

Los estudios que se han realizado encaminados a elucidar la polimerización del alginato han relacionado la actividad alginasa extracelular con la disminución del PM observado durante el proceso de producción (Peña *et al.*, 2000; Trujillo-Roldán *et al.*, 2004). Sin embargo, no se ha estudiado el papel de la actividad alginasa periplásmica en la determinación del PM del polímero. Otros estudios han relacionado los cambios en el PM del alginato con los niveles de transcripción de los genes *algL* y de *alg8* (que codifican para una alginasa periplásmica y para una polimerasa,

respectivamente) (Díaz-Barrera *et al.*, 2011 y 2012). En general, se observó tanto un incremento como una disminución de la expresión de *algB* cuando se sintetiza alginato de alto o bajo peso molecular, respectivamente. Sin embargo, para la expresión de *algL* no existió una correlación entre su nivel de transcripción y el PM del alginato. En los estudios sobre transcripción génica mencionados (Díaz-Barrera *et al.*, 2011 y 2012) el oxígeno en el cultivo no fue controlado, lo que probablemente influyó en la falta de correlación entre la expresión de *algL* y el PM del polímero. Se ha reportado que el oxígeno en el cultivo influye sobre la transcripción de genes involucrados en la biosíntesis de alginato (*algA*, *algC* y *algD*) (Leitão y Sá-Correia, 1997) y en la actividad de sus respectivas proteínas, tanto en *P. aeruginosa* (Leitão y Sá-Correia, 1997) como en *A. vinelandii* (Horan *et al.*, 1983). Asimismo, es también indispensable el análisis de todos los genes involucrados en la determinación del PM (genes que codifican para alginasas como de genes que codifican para polimerasas), así como como de las actividades de sus productos.

El objetivo del presente proyecto fue entender cómo el oxígeno disuelto determina el PM del alginato producido por *A. vinelandii*. Para ello, se analizó, bajo condiciones controladas de oxígeno disuelto y con la cepa silvestre ATCC 9046, la transcripción de todos los genes involucrados en la determinación del PM del alginato, la actividad alginasa intra y extracelular, así como las respuestas fisiológicas de la bacteria a los diferentes niveles de oxígeno en el cultivo. Además, como una forma de analizar el proceso de polimerización y exportación del alginato en la célula, se estudió la transcripción de *algX*, cuyo producto forma parte del complejo proteico de transporte y protección del polímero en el espacio periplásmico, para su excreción al ambiente extracelular.

CAPITULO 2

ANTECEDENTES

2.1. El alginato: estructura, características y fuentes de obtención

Los alginatos son polisacáridos lineales constituidos por ácido β -D-manurónico (M) y ácido α -L-gulurónico (G), unidos por enlaces glicosídicos β -1,4. Su composición varía ampliamente y pueden ser homopoliméricos (formando bloques G o bloques M) o heteropoliméricos (formando bloques MG) (figura 2.1). Se utilizan como espesantes, gelificantes, estabilizantes, en la microencapsulación de células y medicamentos, en la preparación de biocatalizadores y como floculantes. Estas características los hacen muy útiles en la industria alimentaria, farmacéutica, textil, ambiental y de pinturas, entre otras (Rehm y Valla, 1997; Galindo *et al.*, 2007; Sabra y Zeng, 2009; Hay *et al.*, 2013). Recientemente, se ha destacado su uso en aplicaciones biomédicas como soporte para la liberación controlada de biomoléculas activas (antibióticos, enzimas, células) o como matrices en la ingeniería de tejidos debido a sus características de biocompatibilidad, biodegradabilidad y no inmunogenicidad (Lee y Mooney, 2012; Sun y Tan, 2013).

Actualmente los alginatos se extraen de algas marinas, principalmente de las algas caféas (Hay *et al.*, 2013; Sabra y Zeng, 2009) pero pueden ser producidos por bacterias de los géneros *Azotobacter* y *Pseudomonas*. Los alginatos producidos por bacterias como *A. vinelandii* pueden presentar acetilación en el ácido manurónico, en las posiciones O-2 y/o O-3 (Skyak-Braek *et al.*, 1986).

La capacidad viscosificante y gelificante son características muy importantes en el polímero y son determinadas por su peso molecular (PM), por la composición del polímero (relación G/M) y por la acetilación (Rehm y Valla, 1997).

2.1.1. El peso molecular (PM) del alginato y su importancia

El peso molecular del alginato determina la viscosidad del polímero en suspensión (Rehm y Valla, 1997; Ertesvag y Valla, 1998). Clementi (1997) clasificó el alginato en términos de su PM y su

viscosidad: alginatos de alta viscosidad presentan PM de 150 kDa, los de viscosidad intermedia y baja tienen pesos moleculares de 120 y 80 kDa, respectivamente. La mayoría de los alginatos muestran polidispersión en su PM, es decir, en el polímero existen moléculas con diferente PM (familias). En este caso, el PM del polímero se indica como un PM promedio y puede referirse a su índice de polidispersión (IP): mientras menor sea éste, más moléculas del mismo PM constituyen el polímero.

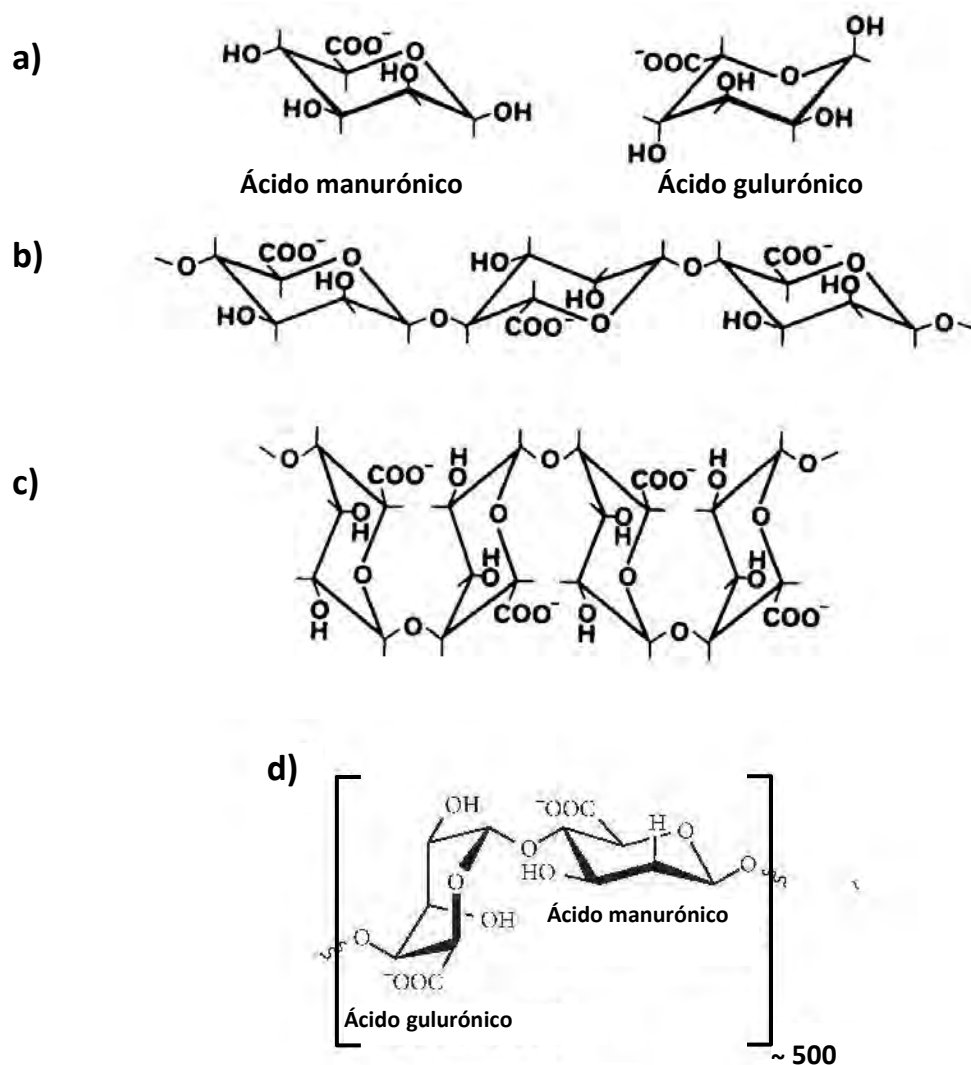


Figura 2.1. Estructura química del alginato bacteriano. a) unidades monoméricas; b) polimannuronato; c) poliguluronato; d) secuencias al azar de las unidades monoméricas.

2.2. *Azotobacter vinelandii*: características y ventajas como productora de alginato.

Azotobacter vinelandii es una bacteria Gram-negativa, que pertenece a las gammaproteobacterias; es de vida libre y habita en suelos (Setubal *et al.*, 2009) y aguas, aeróbica y pleomórfica, variando su morfología desde bacilos hasta cocos (Espin, 2002). Es una bacteria fijadora de nitrógeno, es decir, convierte el nitrógeno atmosférico en amonio, debido a la presencia del complejo enzimático nitrogenasa. En *A. vinelandii*, el complejo está formado por tres nitrogenasas que se diferencian en el cofactor metálico que contienen y son: molibdeno-fierro, vanadio y fierro (Setubal *et al.*, 2009). Debido a la capacidad de fijar nitrógeno, *A. vinelandii* ha sido utilizada como el componente principal de biofertilizantes, a fin de restablecer el nivel de nitrógeno en campo (Gauri *et al.*, 2012).

La bacteria es cultivable sobre diferentes carbohidratos, alcoholes y ácidos orgánicos (Sadoff, 1975; Rediers *et al.*, 2004). En condiciones de limitación de carbono, la bacteria sufre un proceso de diferenciación para formar quistes, que son cuerpos más resistentes a la desecación y a la temperatura (Sadoff, 1975; Setubal *et al.*, 2009). El cuerpo central del quiste está cubierto por dos capas: una capa interna llamada intina y una capa externa llamada exina. El principal componente de estas capas es el alginato; el cuerpo central del quiste presenta una acumulación de gránulos de poli- β -hidroxibutirato (PHB), un poliéster biodegradable, intracelular que se acumula como reserva de carbono.

A. vinelandii es estrictamente aeróbica y presenta una alta velocidad de respiración (Post *et al.*, 1983; Oelze, 2000), lo que ocasiona que durante el cultivo de la bacteria se presenten limitaciones en la disponibilidad de oxígeno (medido como tensión de oxígeno disuelto, TOD) desde etapas tempranas del proceso de fermentación (Díaz-Barrera *et al.*, 2007). Por ello, el oxígeno disuelto adquiere un papel fundamental en el cultivo de la bacteria, principalmente en la producción del alginato y sus características como el peso molecular (Galindo *et al.*, 2007) como se presenta posteriormente.

La presencia de genes que codifican para epimerasas, alginasas, y acetilasas en el genoma de *A. vinelandii* puede representar una ventaja en la producción de alginato, considerando estas proteínas como herramientas para la modificación de las características fisicoquímicas del polímero (Sabra y Zeng, 2009; Setubal *et al.*, 2009). Aunado a lo anterior, en la producción de

alginate por fuentes bacterianas es posible el control de las condiciones de cultivo, lo cual permite la producción de alginate con características fisicoquímicas definidas y reproducibles para aplicaciones específicas en los diferentes sectores industriales, principalmente en el área biomédica y farmacéutica, en donde estas características son esenciales. Para ello, es importante el desarrollo de estudios dirigidos al entendimiento de cada uno de los procesos involucrados en la biosíntesis del alginate, principalmente los que no han sido completamente elucidados, como es el caso de la polimerización.

2.3. Biosíntesis del alginate

La biosíntesis del alginate ha sido investigada tanto en *A. vinelandii* como en *P. aeruginosa*, demostrándose que los mecanismos moleculares son similares en ambas bacterias (Galindo *et al.*, 2007; Hay *et al.*, 2013)

La biosíntesis del alginate se divide en cuatro etapas: 1) La biosíntesis del precursor, el ácido GDP-manurónico, en el citoplasma de la célula; 2) La polimerización y transporte a través de la membrana interna; 3) Modificación del polímero (acetilación y epimerización) y transporte a través del espacio periplásmico 4) La exportación del polímero a través de la membrana externa y epimerización en el ambiente extracelular (Franklin *et al.*, 2011; Hay *et al.*, 2013) (ver figura 2.2). Las reacciones involucradas en la biosíntesis del precursor, el ácido GDP-manurónico, han sido elucidadas tanto en *Azotobacter spp.* como en *Pseudomonas spp.* (Remminghorst y Rehm, 2006a; Muhhamadi y Ahmed, 2007; Galindo *et al.*, 2007). Sin embargo, las etapas de polimerización, modificación y exportación han sido menos entendidas (Whitney *et al.*, 2011). A continuación se hace énfasis en las etapas a partir de la biosíntesis del monómero precursor.

2.3.1. Polimerización del alginate: el complejo alginate polimerasa y alginasas de *Azotobacter vinelandii* y su participación en la polimerización del alginate.

El peso molecular del alginate producido por *A. vinelandii*, es el resultado final del proceso de polimerización, en el que están involucradas proteínas con actividad alginate polimerasa y proteínas con actividad alginate liasa ó alginasas, que depolimerizan el alginate (disminuyen su PM). El complejo alginate polimerasa está constituido por dos proteínas: Alg8 y Alg44, mientras

que las alginasas presentes son al menos cinco, tres periplásmicas (AlgL, AlyA1, y AlyA2) y dos que son excretadas al ambiente extracelular (AlyA3 y AlgE7) (figura 2.2.) (Gimmestad *et al.*, 2009; Setubal *et al.*, 2009).

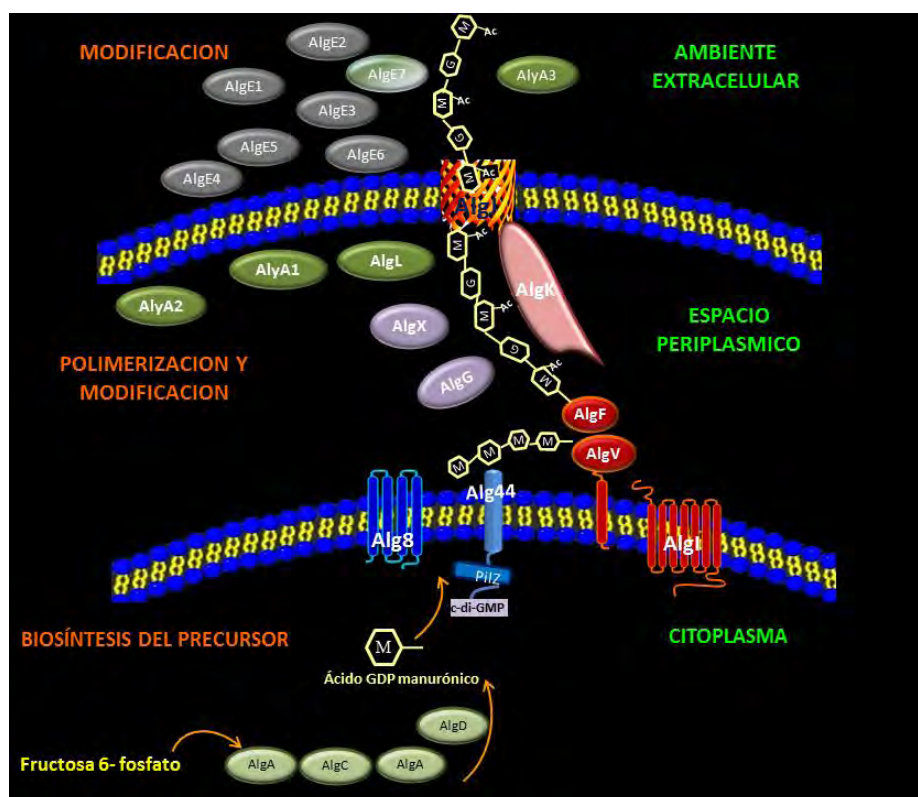


Figura 2.2. Modelo propuesto para la polimerización, acetilación y exportación del alginato en células de *A. vinelandii*. Alg8 y Alg44: subunidades del complejo alginato-polimerasa; AlgI, AlgV y AlgF: complejo acetilasa; AlgL, AlyA1, AlyA2, AlyA3 y AlgE7: alginasas; AlgX, AlgK y AlgG: complejo enzimático para el transporte y protección del polímero a través del periplasma; AlgJ proteína que funciona como canal iónico; AlgE1-AlgE7: epimerasas; G y M: residuos gulurónicos y manurónicos, respectivamente Ac: grupos acetilo. Adaptado de Franklin *et al.*, (2011) y de Hay *et al.*, (2013).

En una cinética típica de producción de alginato, en general, puede observarse un incremento en el PM del polímero durante las primeras horas del cultivo (etapa de polimerización, debido a la actividad del complejo alginato polimerasa); posteriormente, puede presentarse una etapa de depolimerización (debida a la actividad alginasa). La presencia y magnitud de esta

depolimerización depende de las condiciones de cultivo, entre las que destaca el oxígeno disuelto presente en el cultivo de la bacteria.

El alginato es primero sintetizado como homopolímero líneal de residuos de ácido manurónico (polimanuronato). La polimerización y la traslocación del polímero es un proceso que ha sido poco estudiado (Hay *et al.*, 2013). Investigaciones en *P. aeruginosa* y en *A. vinelandii* señalan que el complejo alginato polimerasa está constituido por dos proteínas: Alg8 y Alg44 (Remminghorst y Rehm, 2006b y 2006c; Muhammadi y Ahmed, 2007; Oglesby *et al.*, 2008). Mutantes en *alg8* (Remminghorst y Rehm, 2006b) o en *alg44* generadas en *P. aeruginosa* (Remminghorst y Rehm, 2006c) y en *A. vinelandii* (Mejía-Ruiz *et al.*, 1997) no producen polímero u oligómeros de alginato, demostrando las función de las proteínas correspondientes como constituyentes del complejo alginato polimerasa. Oglesby y colaboradores (2008) sugirieron que Alg44 puede actuar como una co-polimerasa en coordinación con Alg8 y que ambas proteínas son requeridas para la polimerización del alginato *in vivo*. Mejía-Ruiz y colaboradores (1997) reportaron que los genes *alg8* y *alg44* de *A. vinelandii* son altamente homólogos a los correspondientes en *P. aeruginosa*, mientras que las proteínas correspondientes son 77.8 y 59.3 % idénticas, con las correspondientes en *P. aeruginosa*, respectivamente.

2.3.1.1. Características de las polimerasas Alg8 y Alg44

Alg8 es una proteína de membrana citoplásmica que presenta homología con las glicosil transferasas procesivas (GTs) clase II. Alg8 de *A. vinelandii* presenta similitud con la glicosiltransferasa de *Azorhizobium caulinodans* NodC (Mejía-Ruiz *et al.*, 1997).

Las glicosiltransferasas (GTs) son enzimas que catalizan la transferencia de un residuo de azúcar desde un sustrato donador activado hasta un receptor específico. El grupo activador del sustrato dador puede ser un nucleósido-fosfato, fosfato o lípido-fosfato. Las moléculasceptoras pueden ser un azúcar, un lípido, una proteína, un antibiótico, ácido nucleico, etc. En base al número de residuos de azúcar transferidos se pueden reconocer dos tipos de GTs, procesivas y no-procesivas. Las GTs procesivas, como es el caso de Alg8, transfieren múltiples residuos de azúcar en forma sucesiva a la molécula aceptora; mientras que, las no-procesivas catalizan la transferencia de un único residuo de azúcar al aceptor. Además, en las GTs procesivas la adición

del monómero activado a la molécula aceptor (la cadena creciente del polisacárido) se realiza sin la liberación del sustrato aceptor (Price *et al.*, 2002).

En Alg8 se han identificado cuatro dominios transmembranales (TM) y un *loop* citoplásmico donde se predice se encuentra el dominio activo característico de las β -GTs (Oglesby *et al.*, 2008). El dominio transmembranal del carboxilo terminal es indispensable para la reacción de polimerización *in vivo*. Remminghorst *et al.*, (2009) identificaron dominios esenciales para la actividad polimerasa *in vivo*.

Destaca además, que Alg8 en *P. aeruginosa* es indispensable para la biosíntesis del alginato, una mutante en Alg8 no produjo polímero o fragmentos de éste. Además, la introducción de copias extras del gen *alg8* incrementó la producción de alginato en al menos diez veces (Remminghorst y Rehm, 2006b).

Características de Alg44

Alg44 es una proteína localizada en la membrana citoplásmica, que presenta un 16.8 % de similitud con proteínas reguladoras de fusión membranal, como MexA, componente del complejo transportador de antibióticos MexAB-OPr en *P. aeruginosa* (Remminghorst y Rehm, 2006c). Las proteínas de fusión membranal funcionan como proteínas adaptadoras, conectando el transporte de salida desde la membrana citoplásmica hasta la proteína porina, ubicada en membrana externa (Oglesby *et al.*, 2008). Amikan y Galperin (2006) reportaron que Alg44 presenta un dominio PilZ para la unión de c-di-GMP (3',5'-diguanylate cíclico), que se ha ligado a respuestas fisiológicas como la producción de exopolisacáridos, movilidad, formación de *biofilms* y la formación de organelos de adhesión a superficies (Jenal y Malone, 2006; Pasavento y Hengge, 2009) y que es esencial para la producción de alginato.

El análisis topológico de Alg44 señala un solo dominio transmembranal. El dominio PilZ es localizado en el citoplasma, en la región amino-terminal, mientras que la región del carboxilo-terminal se localiza en el periplasma y presenta similitud con proteínas de fusión membranal que participan en el flujo de salida de múltiples fármacos (Oglesby *et al.*, 2008). Estas características, aunado a los requerimientos de la fracción membranal completa para la polimerización *in vitro*

(en la que están presentes Alg44 y otras proteínas) observado por Remminghorst y Rehm (2006b), permiten considerar un papel clave de Alg44 en la polimerización del alginato, proponiéndose un posible papel estructural de Alg44 para la unión de la polimerasa Alg8 (en membrana citoplásmica) y las proteínas de periplasma y membrana externa, lo que permite el tránsito, modificación y secreción del alginato.

Recientemente se reportó (Hay *et al.*, 2009) que la biosíntesis del alginato en *P. aeruginosa* es regulada por MucR, a través de la generación de la poza de c-di-GMP, que se une al dominio PilZ de Alg44. La unión de c-di-GMP se requiere para la biosíntesis del alginato en *P. aeruginosa* (Merigui *et al.*, 2007). MucR contiene un dominio MHYT (que detecta las condiciones ambientales como oxígeno y monóxido de carbono) y un dominio GGDEF, común en diguanilato ciclasas (enzimas que sintetizan c-di-GMP), y un dominio EAL, el cual es conservado en fosfodiesterasas, que hidrolizan c-di-GMP. La activación de una u otra actividad depende de la señal ambiental sensada. Entre las señales ambientales destaca el papel del oxígeno, ya que bajo condiciones microaerófilas, se activa el dominio diguanilato ciclasa, que sintetiza c-di-GMP; mientras que a niveles de oxígeno alto, se activa el dominio fosfodiesterasa, que hidroliza c-di-GMP (Hay *et al.*, 2009; Jenal y Malone, 2006).

2.3.1.2. Papel de las alginasas en la determinación del PM

El alginato es enzimáticamente depolimerizado por alginasas (EC 4.2.2.-), mediante una reacción de β -eliminación, generando oligosacáridos insaturados con dobles enlaces carbono-carbono (C=C) en sus residuos terminales uronato no reductores (Yamasaki *et al.*, 2005).

En el genoma de *A. vinelandii* se han identificado y caracterizado cinco alginasas: AlgL, AlyA1, AlyA2, AlyA3, AlgE7 y una más no caracterizada (Avin46500) (Setubal *et al.*, 2009; Gimmestad *et al.*, 2009). AlgL (Kennedy *et al.*, 1992), AlyA1 y AlyA2 (Gimmestad *et al.*, 2009) son periplásmicas, mientras que AlgE7 (Svanem *et al.*, 2001) y AlyA3 (Gimmestad *et al.*, 2009) son excretadas extracelularmente. La presencia de este número de alginasas en *A. vinelandii* sugieren que la depolimerización del alginato es un proceso complejo. Estudios previos han relacionado la depolimerización del alginato con la actividad alginasa extracelular en cultivos de *A. vinelandii* (Peña *et al.*, 2000; Trujillo-Roldán *et al.*, 2004); sin embargo, considerando la presencia de

alginasas intracelulares en cepas de *Azotobacter*, es importante conocer el papel de la actividad de estas proteínas en la determinación del PM del alginato.

El papel de estas enzimas en *Azotobacter* puede ser crucial para el desarrollo de los quistes, así como en la eliminación del polímero intracelular cuando los quistes revierten a forma vegetativa. Las alginasas encontradas en el periplasma de *Azotobacter*, están presentes en células vegetativas, desaparecen en el enquistamiento y son sintetizadas durante la germinación de los quistes (Kennedy *et al.*, 1992). En el proceso de producción del alginato, la actividad alginasa es inducida por el alginato y puede ser muy baja en los cultivos; sin embargo, es suficiente para causar una drástica caída en el PM del polímero (Clementi, 1997).

2.3.1.3. Especificidad y características de las alginasas de *A. vinelandii*

La especificidad de las alginasas hacia el sustrato está definida por su secuencia de aminoácidos; sin embargo, es difícil determinarla, porque como ya se mencionó, la composición del sustrato (alginato) no posee una distribución regular de los monómeros. En los alginatos existen 4 tipos diferentes de enlaces: M-M, M-G, G-M y G-G (Ertesvag *et al.*, 1998). Las alginasas pueden ser específicas y cortar preferentemente uno o varios de los enlaces previamente mencionados. La acetilación del polímero es otro factor que influye en la actividad de las alginasas. Algunas alginasas de *A. vinelandii* han sido caracterizadas determinándose su especificidad y características fisicoquímicas tales como: PM, pH óptimo, temperatura óptima, entre otras (tabla 2.1). La actividad alginasa puede modificarse con la presencia de cationes. Para AlgE7 y AlyA3 se ha determinado que sus actividades dependen de Ca^{2+} (debido al módulo RTX que poseen) (Svanem *et al.*, 2001; Gimmestad *et al.*, 2009).

Las alginasas AlyA1-3 de *A. vinelandii* muestran preferencia para cortar enlaces de bloques G-M. AlyA3 ha demostrado ser la enzima más inespecífica ya que tiene la capacidad de cortar todos los posibles enlaces que se pueden encontrar en el alginato (G-M, M-G, M-M y G-G) (Gimmestad *et al.*, 2009). AlgE7 y AlyA3 son importantes en la germinación del quiste y en la excreción del alginato al ambiente extracelular. En cuanto a AlyA2 se sugiere que es importante para la bacteria durante el crecimiento vegetativo (Gimmestad *et al.*, 2009).

Tabla 2.1. Alginasas de *A. vinelandii*: Localización y características. Tabla adaptada de Wong *et al.*, (2000) y Gimmetad *et al.*, (2009).

Nombre y Localización	Especificidad de sustrato	PM (kDa)	P. I.	pH óptimo	Dependencia cationes p/ actividad	Cationes inhibidores
AlgL Periplasma	M-M y M-G	39	5.1	8.1 - 8.4	Na ⁺ , no cationes divalentes	
AlGE7 Extracelular	G-GM y G-MM	105		6.9 - 7.3	Ca ²⁺	Mn ²⁺ , Zn ²⁺
AlyA1 Periplasma	GM	25.9	9.7	7.8	ND	ND
AlyA2 Periplasma	GM	26.6	5.6	6.8	ND	ND
AlyA3 Extracelular	MG, GM, MM, GG	49.4	4.2	7.5	Ca ⁺	

P. I. Punto isoeléctrico.

ND.- No determinada.

2.3.2. Modificación del alginato (acetilación y epimerización) en espacio periplásmico.

La acetilación del polímero ocurre en los residuos manurónicos en el periplasma y la realiza el complejo constituido por AlgI, AlgV (AlgJ en *P. aeruginosa*) y AlgF (Franklin y Ohman, 2002). El complejo acetila en los grupos hidroxilo de las posiciones C2 y/o C3 del ácido manurónico. Se ha propuesto que los grupos acetilo son donados por el Acetil coenzima A y transferidos a través de la membrana citoplásmica por AlgI, proteína anclada a membrana citoplásmica. En el periplasma, el grupo acetilo es transferido a AlgF y AlgV para la acetilación del polímero (Franklin y Ohman, 2002).

La epimerización es otra modificación del polímero y se lleva a cabo en periplasma por AlgG. Se realiza en los residuos manurónicos que son epimerizados a gulurónicos. AlgG es también importante para la protección del polímero de la actividad alginasa así como para su transporte a través del espacio periplásmico. Además de AlgG, en el genoma de *A. vinelandii* están presentes siete epimerasas extracelulares (AlGE1-AlGE7) que presentan diferentes especificidades y patrones de epimerización (Ertesvag *et al.*, 2009). Es importante mencionar que AlGE7 es bifuncional, presentando además de la actividad epimerasa, actividad alginasa.

La depolimerización es otra modificación que puede sufrir el alginato en el espacio periplásmico y en el ambiente extracelular. Como ya se mencionó, en *A. vinelandii* están presentes alginasas periplásmicas y alginasas que fueron excretadas al ambiente extracelular (tabla 2.1).

El polímero debe ser transportado desde la membrana citoplásmica, y a través del espacio periplásmico, hasta la membrana externa para su excreción al ambiente extracelular. Se ha propuesto que el complejo enzimático formado por AlgG, AlgX y AlgK forman un andamiaje que protege el polímero que se va generando de las alginasas presentes en periplasma y lo guía durante el transporte por el periplasma hasta su exportación fuera de la célula (Robles-Price *et al.*, 2004). Sorprendentemente, en este proceso y en estudios realizados con *P. aeruginosa*, se ha señalado la participación de la alginasa AlgL en la protección del polímero (Jain y Ohman, 2005). El polímero es exportado fuera de la célula a través de AlgJ, (AlgE en *P. aeruginosa*) una porina de membrana externa que presenta un conducto altamente electropositivo, rico en arginina y altamente selectiva para aniones (Whitney *et al.*, 2011), esencial para la excreción del alginato.

2.3.3. Genética de la biosíntesis de alginato en *A. vinelandii*

Los genes que codifican para las enzimas participantes en la biosíntesis del alginato por *A. vinelandii* ya han sido identificados. Los productos de los genes *algA* (la enzima fosfomanosa-isomerasa/GDP-manosa pirofosforilasa) y *algC* (fosfomanomutasa) que catalizan los tres primeros pasos de la biosíntesis del monómero precursor (ácido GDP-manurónico), participan también en el metabolismo general de los carbohidratos y por ello, se encuentran en muchas bacterias; sin embargo, la enzima GDP-manosa deshidrogenasa codificada por el gen *algD*, que es la enzima clave en la biosíntesis del alginato y que cataliza la oxidación irreversible de la manosa al ácido GDP-manurónico (Rehm, 2009) es específica para la biosíntesis de alginato tanto en algas como en bacterias productoras de alginato.

En *A. vinelandii*, con la excepción de *algC*, todos los genes se localizan en la misma región del cromosoma o “cluster” (figura 2.3) (Gaona *et al.*, 2004; Galindo *et al.*, 2007). Se han identificado los siguientes promotores: *algCp1* y *algCp2* río arriba de *algC*; *algDp1*, *algDp2* y *algDp3* río arriba de *algD*; *alg8p1* río arriba de *alg8*; un promotor localizado río arriba de *algG* y otro río arriba de

algA (Galindo *et al.*, 2007). Sin embargo, no se descarta la presencia de otros promotores internos tal como se ha demostrado recientemente para *P. aeruginosa* (Paletta y Ohman, 2012).

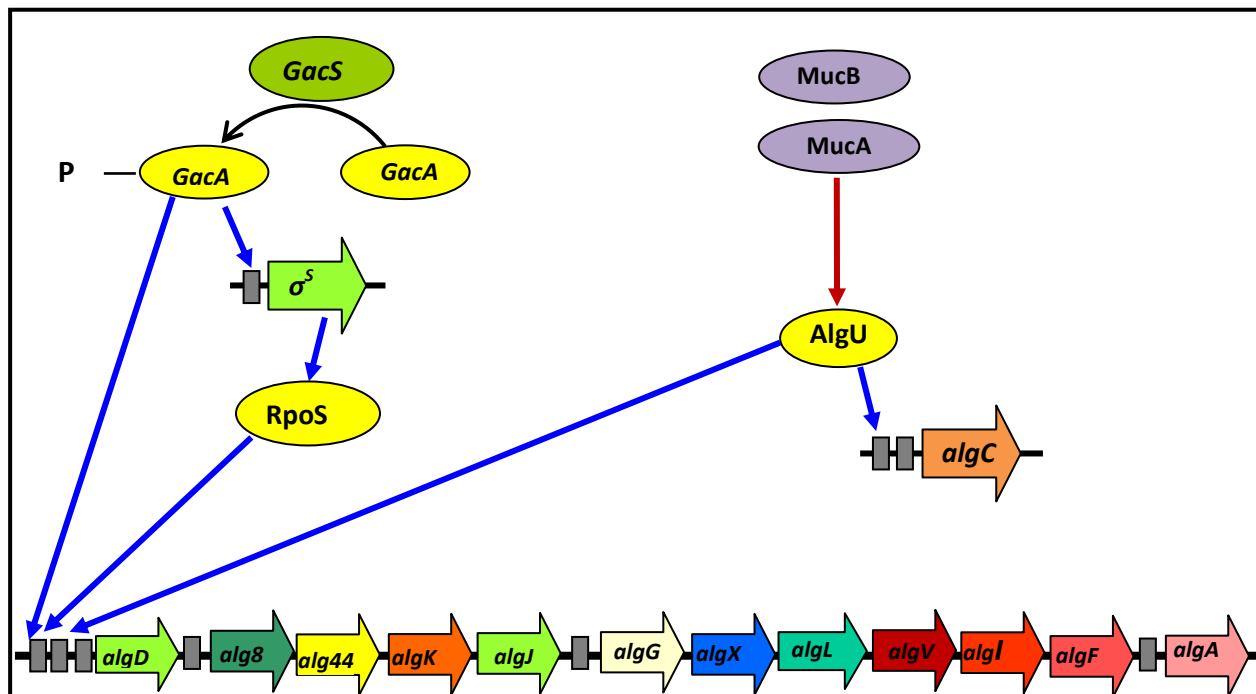


Figura 2.3. Organización de los genes biosintéticos del alginato en *A. vinelandii*. Se presenta el modelo de regulación para la biosíntesis de alginato. Líneas azules señalan regulación positiva, líneas rojas regulación negativa. Rectángulos grises indican promotores. Adaptada de Galindo *et al.*, 2007.

La transcripción de los genes de biosíntesis del alginato es controlada positivamente por los factores sigma AlgU y RpoS (figura 2.3). Ambos son requeridos para la activación de dos promotores de *algD* (Martínez-Salazar *et al.*, 1996; Castañeda *et al.*, 2001). *algU* codifica para el factor sigma E requerido para la transcripción del promotor *algCp1* y *algDp2*. El factor sigma RpoS participa en el proceso de enquistamiento de *A. vinelandii*, regulando la expresión de genes estructurales de la biosíntesis de otros componentes de los quistes, del PHB y de alquilresorcinoles (Romero *et al.*, 2013). MucA y MucB son dos proteínas que controlan negativamente la transcripción, actuando como factores antisigma AlgU. La expresión de *algD* está también bajo el control del sistema GacS-GacA. GacS actúa como una histidina cinasa sensora que fosforila a GacA, la cual en su forma fosforilada, activa la transcripción de *algD*. GacA también controla la transcripción de *rpoS*. A nivel traduccional, la expresión de *algD* es también controlada por el sistema GacS-Rsm (Castañeda *et al.*, 2000).

2.4. Parámetros de proceso que influyen en la biosíntesis y en el PM del alginato producido por *A. vinelandii*.

La producción de alginato por *A. vinelandii*, ha sido ampliamente estudiada. Se ha evaluado el tipo de fuente de carbono, la composición del medio de cultivo, el procesamiento del inóculo, la agitación, la temperatura, el pH, la aereación, la concentración de CO₂, el oxígeno disuelto medido como tensión de oxígeno disuelto (TOD), la velocidad de transferencia de oxígeno (VTO) la potencia suministrada al sistema, así como el uso de cepas mutantes. Las revisiones de Clementi (1997), Galindo *et al.* (2007) y Peña *et al.*, (2011) presentan una descripción del efecto de los parámetros antes mencionados sobre la producción y características del alginato. Entre ellos, destaca la influencia que ejerce el oxígeno disuelto sobre la producción del polímero y sobre su PM.

2.4.1. Influencia del oxígeno sobre el metabolismo de *A. vinelandii*

En *A. vinelandii*, la fuente de carbono puede convertirse en alginato, polihidroxibutirato (PHB), CO₂ y biomasa. El PHB es un poliéster intracelular, biodegradable y por ello, de interés industrial como un sustituto de plásticos derivados del petróleo. En la célula, el PHB es almacenado como fuente de carbono durante el crecimiento bajo limitación de nutrientes. Fisiológicamente, la acumulación de PHB y la producción de alginato están asociadas con el enquistamiento de las células y es difícil separar la síntesis de ambos polímeros. En función de la TOD puede favorecerse el crecimiento de la bacteria y/o la generación de uno u otro producto (alginato, PHB, biomasa). A TOD baja (< 1 %), se favorece la acumulación de PHB; a TOD cercana al 10 %, la bacteria utiliza la fuente de carbono principalmente para la producción de biomasa. TOD entre 2.5 y 5 % favorece la producción de alginato (Sabra *et al.*, 1999; Peña *et al.*, 2000). Desde un punto de vista cinético, en cultivos sin control de TOD, la producción de alginato se encuentra parcialmente asociada al crecimiento de la bacteria (Parente *et al.*, 1998; Peña *et al.*, 2000). Con control de TOD en el rango de 0.5 a 5 %, la síntesis de alginato se encuentra totalmente asociada al crecimiento (Peña *et al.*, 2000). Además, un efecto particularmente importante es la influencia que la TOD presenta sobre el PM del polímero y su homogeneidad, como se muestra a continuación.

2.4.2 Factores involucrados en la determinación el PM del alginato en *A. vinelandii*

En la literatura, los estudios encaminados al entendimiento de la determinación del PM del alginato son escasos. Investigaciones realizadas con *Azotobacter spp.* y en diferentes medios de cultivo han demostrado que el PM del alginato está determinado en función de la TOD del cultivo (Parente *et al.*, 1998; Sabra *et al.*, 1999; Parente *et al.*, 2000; Peña *et al.*, 2000; Trujillo-Roldán *et al.*, 2004). Sin embargo, hasta antes de este proyecto no se habían estudiado las respuestas fisiológicas o moleculares que el oxígeno modifica y a través de las cuales está determinando el peso molecular del alginato.

La actividad alginasa extracelular ha sido relacionada con cambios en el PM del polímero en términos de la depolimerización observada durante el proceso de producción del polímero. Peña *et al.*, (2000) y Trujillo-Roldán *et al.*, (2004), observaron una disminución del peso molecular del polímero en la etapa final de los cultivos, en algunos casos, hasta valores similares a los iniciales (Peña *et al.*, 2000). Peña y colaboradores (2000) analizaron la actividad alginasa de caldos de *A. vinelandii* cosechado a diferentes tiempos de cultivo. El sobrenadante fue incubado con alginato comercial, observándose una disminución en el PM del polímero de 350 kDa a 47 kDa, correlacionando con un incremento en la actividad alginasa extracelular de 0.013 a 0.020 U/mg_{proteína}. Por su parte, Trujillo-Roldán *et al.*, (2004) reportó la influencia de la TOD sobre la actividad alginasa extracelular en *A. vinelandii* cultivada a 1, 3 y 5% de TOD, observando que la actividad alginasa extracelular específica fue más alta en cultivos a 3% de TOD (1.2 U/mg_{proteína} respecto de 0.8 y 0.3 U mg/_{proteína} para 1 y 5 % de TOD, respectivamente). Además, la actividad fue más alta en la fase exponencial tardía de crecimiento, mientras que una disminución se observó en la fase estacionaria. Sin embargo, considerando la presencia de alginasas intracelulares en cepas de *Azotobacter*, es importante conocer el papel de la actividad alginasa intracelular en la determinación del PM del polímero.

Es posible que el oxígeno disuelto presente durante el proceso de producción del polímero influya sobre la transcripción de los genes y/o sobre la actividad de sus productos. En este sentido, Leitão y Sá-Correia, (1997) analizaron la influencia de la TOD sobre la expresión de genes involucrados en la biosíntesis del alginato (*algA*, *algC* y *algD*) en *P. aeruginosa*, así como la actividad de sus productos. En *A. vinelandii* la actividad de las proteínas AlgA, AlgC y AlgD en función de la TOD fue analizada por Horan *et al.*, (1983). Respecto de la polimerización, no se han

realizado los estudios correspondientes en cuanto a transcripción de los genes y actividad de las proteínas involucradas en la determinación del PM del alginato en función de la TOD. Sólo se ha reportado la transcripción del gen *alg8* y de la alginasa *algL* a diferentes condiciones de cultivo y relacionándolos con el PM del alginato, como se describe a continuación y además se presenta en la tabla 2.2.

2.5. Transcripción de *alg8* y *algL* y su relación con el PM del alginato

Los estudios previos que se han realizado encaminados al entendimiento del proceso de polimerización en *A. vinelandii*, no han sido desarrollados de forma integral. *alg8* y *algL* son los dos únicos genes cuya expresión se ha vinculado en la determinación del PM del alginato. Trujillo-Roldán *et al.*, (2004) evaluaron la participación de *algL* (como ausencia o presencia) en una cepa mutante en *algL*, observando que el gen no es indispensable en la biosíntesis del alginato por *A. vinelandii*. Más recientemente, estudios en *A. vinelandii* desarrollados a diferentes condiciones de cultivo han relacionado los cambios en el PM del alginato con la transcripción de *alg8* y *algL* (Díaz-Barrera *et al.*, 2011 y 2012). En un primer estudio Díaz-Barrera *et al.*, (2011), evaluaron la transcripción de *alg8* y *algL* en función del consumo de oxígeno en cultivos continuos de *A. vinelandii*, observando que cuando se produce alginato de alto peso molecular (de 1300 kDa), a bajas velocidades de consumo de oxígeno, la transcripción de *alg8* se incrementó y la de *algL* disminuyó. En contraste, cuando se generó alginato de bajo PM (350 kDa) -a altas velocidades de consumo de oxígeno-, la transcripción de *alg8* disminuyó y la de *algL* se incrementó. Sin embargo, en otro trabajo reportado posteriormente por esos mismos autores (Díaz-Barrera *et al.*, 2012), se analizó nuevamente la transcripción de *alg8* y *algL* y el PM del polímero, al variar la agitación y la entrada de sacarosa en la alimentación de cultivos continuos. Los resultados mostraron un incremento y disminución (de 7 veces) de la expresión de *alg8* cuando se sintetiza alginato de alto o bajo peso molecular, respectivamente. Sin embargo, para la expresión de *algL*, a diferencia de lo observado en el estudio anterior, no existió correlación entre su nivel de transcripción y el PM del alginato. Probablemente la falta de correlación entre la expresión de *algL* y el PM del polímero se deba a la falta de control de la TOD y/o de otras condiciones de cultivo como la agitación.

En la tabla 2.2 se presenta, en resumen, los aspectos estudiados y reportados en la literatura sobre el proceso de polimerización del alginato en *A. vinelandii* y los que requieren realizarse a fin de conocer de forma integral, el proceso de polimerización.

Tabla 2.2. Aspectos involucrados en la polimerización del alginato producido por *A. vinelandii*: comparación entre los ya estudiados y los que requieren estudiarse.

Aspecto estudiado	Referencia
Peso molecular del alginato en función de la TOD	Trujillo-Roldán <i>et al.</i> , 2004. Peña <i>et al.</i> , 2000.
Actividad alginasa extracelular	Trujillo-Roldán <i>et al.</i> , 2004. Peña <i>et al.</i> , 2000
Actividad alginasa intracelular	No estudiado
<i>algL</i> (como presencia y como ausencia, utilizando una mutante)	Trujillo-Roldán <i>et al.</i> , 2003. Trujillo-Roldán <i>et al.</i> , 2004.
Análisis transcripcional de los genes constituyentes del complejo alginato polimerasa (<i>alg8</i> and <i>alg44</i>)	Sólo <i>alg8</i> Díaz-Barrera <i>et al.</i> , 2011 y 2012)
Análisis transcripcional of genes que codifican para alginasas (<i>algL</i> , <i>alyA1</i> , <i>alyA2</i> , <i>alyA3</i> , and <i>algE7</i>).	Sólo <i>algL</i> Díaz-Barrera <i>et al.</i> , 2011 y 2012
Analisis transcripcional de <i>algX</i> (cuyo producto está involucrado en el transporte del alginato a través del espacio periplásmico).	No estudiado

Para entender cómo el oxígeno disuelto determina el peso molecular del alginato, es importante el análisis de todos los genes involucrados. Por ello, en este proyecto se incluyó el análisis tanto de los genes constituyentes del complejo alginato polimerasa (*alg8* y *alg44*), como de todos los genes que codifican para las alginasas (*algL*, *alyA1*, *alyA2*, *alyA3* y *algE7*). Asimismo, considerando que el polímero requiere ser transportado a través del periplasma para su posterior excreción al ambiente extracelular, se incluyó en este estudio el análisis de *algX*, cuyo producto participa en el complejo proteico de transporte y protección del polímero por el espacio periplásmico. Además, la actividad alginasa intra y extracelular fue analizada durante todo el proceso de fermentación. Este estudio fue realizado en cultivos en lote de *A. vinelandii* ATCC9046, desarrollados a 1 y 5 % de tensión de oxígeno disuelto, y en condiciones controladas de temperatura (29°C), pH (7.2) y agitación (500 rpm):

El conocimiento de los efectos de la tensión de oxígeno sobre los parámetros directamente involucrados en la determinación del PM es indispensable para elucidar el mecanismo mediante el cual se determina el peso molecular del alginato biosintetizado por *A. vinelandii*. Con lo anterior, será posible establecer estrategias que permitan la producción de alginato bacteriano con características definidas, en términos de su peso molecular.

CAPITULO 3

OBJETIVOS

Objetivo general:

Estudiar el o los mecanismo(s) por el cual el oxígeno disuelto determina el peso molecular del alginato producido en cultivos *de Azotobacter vinelandii*.

Objetivos específicos:

- Estudiar la influencia de la tensión de oxígeno disuelto sobre la cinética de producción de alginato y la evolución del peso molecular.
- Analizar la expresión de los genes que determinan el peso molecular del alginato: genes del complejo alginato polimerasa (*alg8*, *alg44*) y genes que codifican para alginasas (*algL*, *alyA1*, *alyA2*, *alyA3* y *algE7*) y conocer su relación con el PM del alginato.
- Evaluar la expresión de *algX*, cuya proteína codificada participa en el transporte y protección del polímero por el espacio periplásmico.
- Evaluar la actividad alginasa, intra y extracelular, y su relación con el PM del alginato biosintetizado.

CAPITULO 4

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para conocer cuál o cuáles son las respuestas fisiológicas que el oxígeno disuelto modifica, y que son las que están determinando el PM del polímero producido por *A. vinelandii*, se utilizaron técnicas de PCR en tiempo real que permitieron conocer los niveles de transcripción de los genes constituyentes del complejo alginato polimerasa y de las alginasas, en dos etapas de cultivo (fase exponencial y fase estacionaria de crecimiento). Asimismo, se analizó la actividad alginasa tanto intracelular como extracelular durante todo el proceso de producción del alginato, lo cual permitió, de forma indirecta, conocer la actividad polimerasa, y con ello, determinar la contribución de cada uno de los factores involucrados en la determinación del peso molecular del alginato. Estos análisis se realizaron en cultivos desarrollados bajo condiciones controladas (pH, temperatura, agitación, oxígeno disuelto) durante todo el proceso de fermentación. Además, se utilizó como inóculo células en las que el sobrenadante fue descartado, para evitar la influencia de oligosacáridos (producidos en el inóculo) que influyeran en la evolución del peso molecular de los procesos.

CAPITULO 5

MATERIALES Y METODOS

5.1. Cepa: Se utilizó la bacteria *Azotobacter vinelandii* ATCC9046. La cepa se preservó en cajas Petri con Medio Burk modificado (MBM, Tabla 5.1), excepto que en el medio para la preservación se excluyó la fuente de nitrógeno (acetato de amonio) y se incluyó MOPS (ácido 3-morfolinopropano-1-sulfónico) y agar a una concentración de 1.42 y 18 g/L, respectivamente. Se realizaron resiembras mensuales, incubándose 48 h, a 29°C. La cepa se mantuvo a 4°C.

5.2. Medio de cultivo: Se utilizó MBM constituido por sacarosa y acetato de amonio como fuente de carbono y nitrógeno, respectivamente. El resto de los reactivos que constituyeron el medio se presentan en la tabla 5.1.

Tabla 5.1. Composición del Medio Burk Modificado.

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

Para evitar precipitación, los componentes del medio se disuelven y esterilizan por separado, de acuerdo a como se describe a continuación, para la preparación de un litro de medio de cultivo. La sacarosa, el acetato de amonio y los fosfatos se disolvieron en 800 mL de agua destilada. A esta mezcla se ajustó el pH a 7.2 con NaOH 2N antes de su esterilización. El sulfato de calcio fue disuelto en 50 mL de agua destilada; la mezcla del resto de las sales se disolvieron en 50 mL de agua destilada. Las tres soluciones se esterilizaron por separado y se mezclaron en condiciones estériles. 100 mL fueron considerados para el inóculo (relación de 10 % v/v).

5.3. Desarrollo de los cultivos en biorreactor de 3L

5.3.1. Preparación del inóculo. Para el pre-inóculo se generaron células frescas, sembrando la cepa preservada, en caja Petri con MBM (preparado como se describe en la sección 5.1), e incubando a 29°C por 48 h. El inóculo para el biorreactor fue preparado en matraces Erlenmeyer de 500 mL con 100 mL de MBM. En cada matraz se inocularon dos azadas de las células generadas en cajas Petri (pre-inóculo) y estos fueron incubados a 29°C y 200 rpm durante 12-14 h, tiempo requerido para alcanzar una densidad óptica (a 540 nm) de 0.16 ± 0.02 utilizando una dilución 1/50. Las células de dos matraces (200 mL) fueron recuperadas por centrifugación (11 000 rpm, 10 min) y resuspendidas en medio fresco (Trujillo-Roldán *et al.*, 2003). El volumen del inóculo correspondió al 10 % (v/v) del volumen total de trabajo.

5.3.2. Descripción del biorreactor y las condiciones de operación

Los cultivos se realizaron en un biorreactor Applikon (Schiedam, Netherlands) de 3.0 L de volumen nominal, con un volumen de trabajo de 2.0 L, equipado con 2 impulsores tipo turbina Rushton (diámetro = 4.6 cm) con una relación diámetro del impulso/diámetro del tanque(D/T) de 0.36. y un difusor de aire con 7 orificios. El pH se midió en línea utilizando un electrodo de pH (Ingold), y se mantuvo constante en 7.2 mediante la adición automática de NaOH 2N. El control de espuma se realizó de forma manual utilizando una bomba peristáltica y con la adición de antiespumante (silicona al 10 %, P/V). La TOD fue determinada mediante un electrodo polarográfico de oxígeno (Applikon Biotechnology, Schiedam Netherlands). La señal fue transmitida a un amplificador y adquirida por una PC Compac deskpro. La TOD fue controlada en línea mediante mezcla de gases de oxígeno y nitrógeno, manteniendo un flujo constante de 0.5 L/min. El flujo de cada uno de los gases (oxígeno y nitrógeno) fue controlado mediante un controlador de flujo másico (5850 F, Brook Instruments B.V.) y utilizando un algoritmo proporcional integral derivativo (PID) (Lozano *et al.*, 2011). La temperatura y agitación se controlaron a 29°C y 500 rpm, respectivamente.

Los resultados representan el promedio de tres cultivos independientes. Para determinar diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones evaluadas, se realizó la prueba de *t* de Student, utilizando un intervalo de confianza del 95 %.

5.4. Métodos analíticos

5.4.1. Cuantificación de biomasa.- Se determinó mediante la medición gravimétrica del peso seco. La descripción de la técnica se presenta en el anexo 2.

5.4.2. Cuantificación de alginato.- El alginato se extrajo mediante su precipitación con isopropanol y posteriormente se cuantificó por gravimetría de acuerdo al procedimiento que se presenta en el anexo 2.

5.4.3. Cuantificación de proteína.- Se cuantificó por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). La técnica se describe en el anexo 2.

5.4.4. Cuantificación de sacarosa residual.- Se determinó espectrofotométricamente utilizando el método de ácido dinitrosalicílico (DNS) (Sigma-Aldrich) reportado por Miller (1959). En la reacción se forma un compuesto aminado amarillo, cuya densidad óptica a 540 nm es proporcional a la concentración de los grupos reductores. La descripción de la técnica se presenta en el anexo 2.

5.4.5. Determinación del peso molecular promedio del alginato.- Se determinó por cromatografía de filtración en gel (GPC) usando una serie de columnas Ultrahidrogel (UG 500 y 2000, Waters) de 7.8 mm (diámetro interno) por 300 mm, acopladas a un equipo de HPLC (Waters, 2695) con un detector de índice de refracción (Waters, 2414). Las condiciones del análisis se muestran en el anexo 2.

5.4.6. Cuantificación de PHB.- El PHB se determinó como ácido crotónico, el cual se produce por la hidrólisis con ácido sulfúrico concentrado. La técnica se adaptó de Karr *et al.*, (1983). La cuantificación se realizó por HPLC, con una columna Aminex HPX-87H (Biorad). Las condiciones del método de análisis se presentan en el anexo 2.

5.4.7. Cuantificación de amonio.- Se cuantificó por el método del indofenol propuesto por Kaplan (1969). La reacción involucra la transformación del amonio a cloramina mediante la acción del hipoclorito. Posteriormente, la cloramina reacciona con el fenol originando el cromógeno azul denominado p-hidroxifenil imino benzoquinona, que absorbe a 635 nm y cuya

densidad óptica es proporcional a la concentración de amonio. La descripción de la técnica se presenta en el anexo 2.

5.4.8. Actividad alginasa extracelular.- Se cuantificó mediante un método espectrofotométrico (Espectrofotómetro Beckman DU® 650) de acuerdo al método reportado por Ertesvåg *et al.*, (1998). Los ácidos urónicos con doble enlace, generados por el rompimiento del enlace glicosídico por la acción de las alginasas, absorben a 235 nm. La descripción de la técnica se presenta en el anexo 2.

5.4.9. Actividad alginasa intracelular.- La extracción de la fracción periplásmica se realizó de acuerdo al procedimiento reportado por Franklin y Ohman (2002). La descripción de la técnica se presenta en el anexo 2.

5.4.10. Cuantificación de CO₂ en el gas efluente del reactor.- El CO₂ se cuantificó (%) en la salida del gas efluente del biorreactor, mediante un detector infrarojo (Teledyne Analytical Instruments, modelo 7500). Para el funcionamiento del equipo fue indispensable evitar la humedad en la entrada del gas efluente al detector, para lo cual se instaló una trampa con sílica (deshumidificador) entre la salida del gas del biorreactor y la entrada al detector.

5.4.11. Velocidad de transferencia de oxígeno y consumo específico de oxígeno

La velocidad de transferencia de oxígeno (VTO) se calculó con la siguiente ecuación:

$$VTO = K_{La} * (C^* - C_L)$$

donde K_{La} es el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (h^{-1}), C^* es la concentración de saturación de oxígeno en el líquido ($mmol L^{-1}$) y C_L es la concentración de oxígeno presente en el reactor ($mmol L^{-1}$). Para las condiciones de operación del presente estudio se estimó un K_{La} de $45 h^{-1}$.

En régimen permanente, la VTO es igual a la velocidad de consumo de oxígeno (VCO), por lo que la velocidad específica de consumo de oxígeno (qO_2) se calculó a partir de los datos experimentales de la VTO_{max} y la concentración de biomasa (X ; g/L), empleando la siguiente ecuación:

$$qO_2 = \frac{VTO_{max}}{X}$$

Conocida la VTO (VCO) y con los datos experimentales de la velocidad de producción de CO₂ (VPC), se calculó el coeficiente respiratorio (CR), con la siguiente ecuación:

$$CR = \frac{VPC}{VCO}$$

5.4.12. Análisis de transcripción génica mediante PCR en tiempo real

Recuperación de células: 8 mL de caldo de cultivo, tomados en fase exponencial y en fase estacionaria, fueron centrifugados a 4 000 rpm, 20 min, a 4°C. El paquete celular fue congelado a -20°C, hasta realizar la extracción de RNA.

Extracción, purificación de RNA y análisis por PCR en tiempo real (RT-PCR)

Extracción del RNA.- Se realizó de acuerdo al método descrito por Barry *et al.*, (1992). La descripción de la técnica para la extracción y cuantificación del RNA, así como el tratamiento del RNA con DNasa se presentan en el anexo2.

Síntesis de cDNA.- Para la transcripción reversa se utilizaron 200 ng de RNA de cada condición y se utilizó un Kit Revert Aid™ H minus First Strand cDNA Synthesis (Fermentas Life Science), según la metodología recomendada por el proveedor. Los detalles del desarrollo de la técnica se presentan en el anexo2.

PCR de tiempo real.- Se realizó con un equipo ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Perkin-Elmer/Applied Bio-systems) usando SYBR Green PCR Master Mix (Fermentas Life Science), de acuerdo al procedimiento descrito en el anexo 2. La secuencia de los primers para cada uno de los genes analizados se presenta en la tabla 5.2.

Table 5.2. Primers utilizados para los análisis de PCR en tiempo real.

Gene	Forward primers (5' to 3')	Reverse primers (5' to 3')
<i>gyrA</i>	CCAGCAAGGGCAAGGTCTA	TCGTCCAGCGGCAACAGGT
<i>alg8</i>	GATCATCGGCTCCATCAAAT	GTCCGAAAGAGACAACAGC
<i>alg44</i>	AGATGAAGGGCACCTGAC	AGCAGCTCGAAGATCACCTG
<i>algX</i>	TTTCGAGCAACTCGGCTACT	TAGGAGGTCCAGTGGTGGTC
<i>algL</i>	CTGCTCACCACCGAGTACAA	GCGAACTGGAGAATTTTCAGG
<i>alyA1</i>	TATTTACCCACGCTCCGAAC	GCACTCAAACGGTGGATCTT
<i>alyA2</i>	GTCCAATCATCCTCCCTTCA	GTTCTTTGCCGTTTCAGCTTC
<i>alyA3</i>	GCCTCCTCAACTTCTGCAAC	TACCTTGTATCCCCACCAT
<i>algE7</i>	ATCGACGGTAACCAGGACAA	TCGACCGTGACGTTGTAGTC

CAPITULO 6

RESULTADOS Y DISCUSION

6.1. Crecimiento y producción de alginato y PHB durante el cultivo de *A. vinelandii* a TOD's de 1 % y 5 %.

6.1.1. Control de la TOD en los cultivos

Diversas investigaciones han mostrado que el oxígeno disuelto es un parámetro relevante en la producción de alginato (Parente *et al.*, 1998; Sabra *et al.*, 1999; Peña *et al.*, 2000; Trujillo-Roldán *et al.*, 2004) y en el peso molecular del polímero (Peña *et al.*, 2000; Trujillo-Roldán *et al.*, 2004). Sin embargo, no se conocen las respuestas fisiológicas que el oxígeno disuelto modifica y, que son a través de las cuales, determina el peso molecular del alginato. Para estudiar lo anterior, la TOD fue estrictamente controlada durante todo el proceso de fermentación. El control de la TOD (a 1 y 5 %) se realizó mediante la mezcla de gases de oxígeno y nitrógeno y utilizando un sistema de control previamente reportado (Lozano *et al.*, 2011). Como se observa en la figura 6.1, se logró un control eficiente de la TOD durante todo el proceso de producción del alginato. En los cultivos desarrollados a 5 % de TOD el control se mantuvo en promedio en 4.87 ± 0.55 y en los desarrollados a 1 % la TOD en promedio fue de 0.96 ± 0.27 .

6.1.2. Crecimiento celular, producción de alginato y PHB.

El crecimiento celular (medido como contenido de proteína), la producción de alginato, PHB y el consumo de sustrato se presentan en la figura 6.2. El incremento en la TOD favoreció el crecimiento celular y la velocidad específica de crecimiento (figura 6.2a y tabla 6.1). En los cultivos desarrollados a 5 % de TOD se alcanzó una concentración de proteína de 0.75 ± 0.12 g/L, en un tiempo de cultivo corto (21 h), mientras que en los cultivos desarrollados a 1 % TOD la máxima concentración de proteína fue 0.5 ± 0.07 g/L, a las 30 h. Las diferencias en el contenido de proteína fueron estadísticamente significativas. Las velocidades específicas de crecimiento de la bacteria en los cultivos a 5 % y 1 % fueron de 0.17 h^{-1} y 0.08 h^{-1} , respectivamente (tabla 6.1).

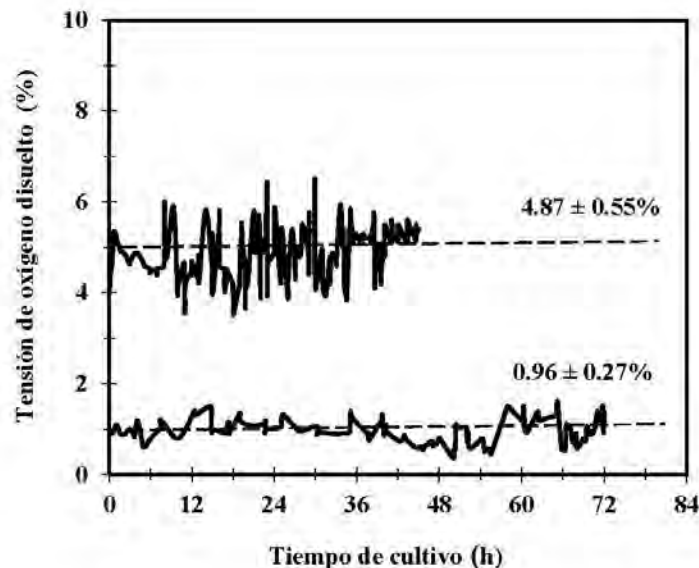


Figura 6.1. Perfiles de la tensión de oxígeno disuelto a 1 y 5 %, durante el proceso de producción de alginato por *A. vinelandii*. Cultivos desarrollados bajo condiciones controladas de temperatura (29°C), pH (7.2) y agitación (500 rpm).

En cuanto a la producción de PHB, la figura 6.2b muestra que en los cultivos desarrollados a 1 % de TOD, la fuente de carbono fue principalmente dirigida hacia la síntesis de PHB, generándose hasta 3.5 ± 0.53 g/L; mientras que en los cultivos a 5 % de TOD, la concentración de PHB no rebasó los 0.2 ± 0.07 g/L (figura 6.2b). El incremento en la producción de PHB en cultivos desarrollados bajo condiciones limitantes de oxígeno ha sido reportado por otros autores (Horan *et al.*, 1983; Sabra *et al.*, 1999) y es característico de *A. vinelandii* (Senior y Dawes, 1973; Brivonese y Sutherland, 1989). Este comportamiento es debido a que en condiciones limitantes de oxígeno, la acumulación de cofactores NADPH y NADH, inhiben la actividad de la citrato sintasa y la isocitrato deshidrogenasa, ocasionando la disminución del flujo de carbono hacia el ciclo de Krebs, lo que favorece la desviación de acetil-CoA (precursor del PHB), hacia la síntesis de PHB.

La producción de alginato se presenta en la figura 6.2c. Las concentraciones alcanzadas bajo las dos condiciones de TOD evaluadas fueron de 1.9 ± 0.1 g/L y 2.4 ± 0.3 g/L, para 1 y 5 % de TOD, respectivamente). La figura 6.2c claramente muestra que una alta TOD favoreció la productividad del proceso. Las productividades fueron de 0.03 g/L h y 0.1 g/L h para los cultivos a 1 y 5% de TOD, respectivamente.

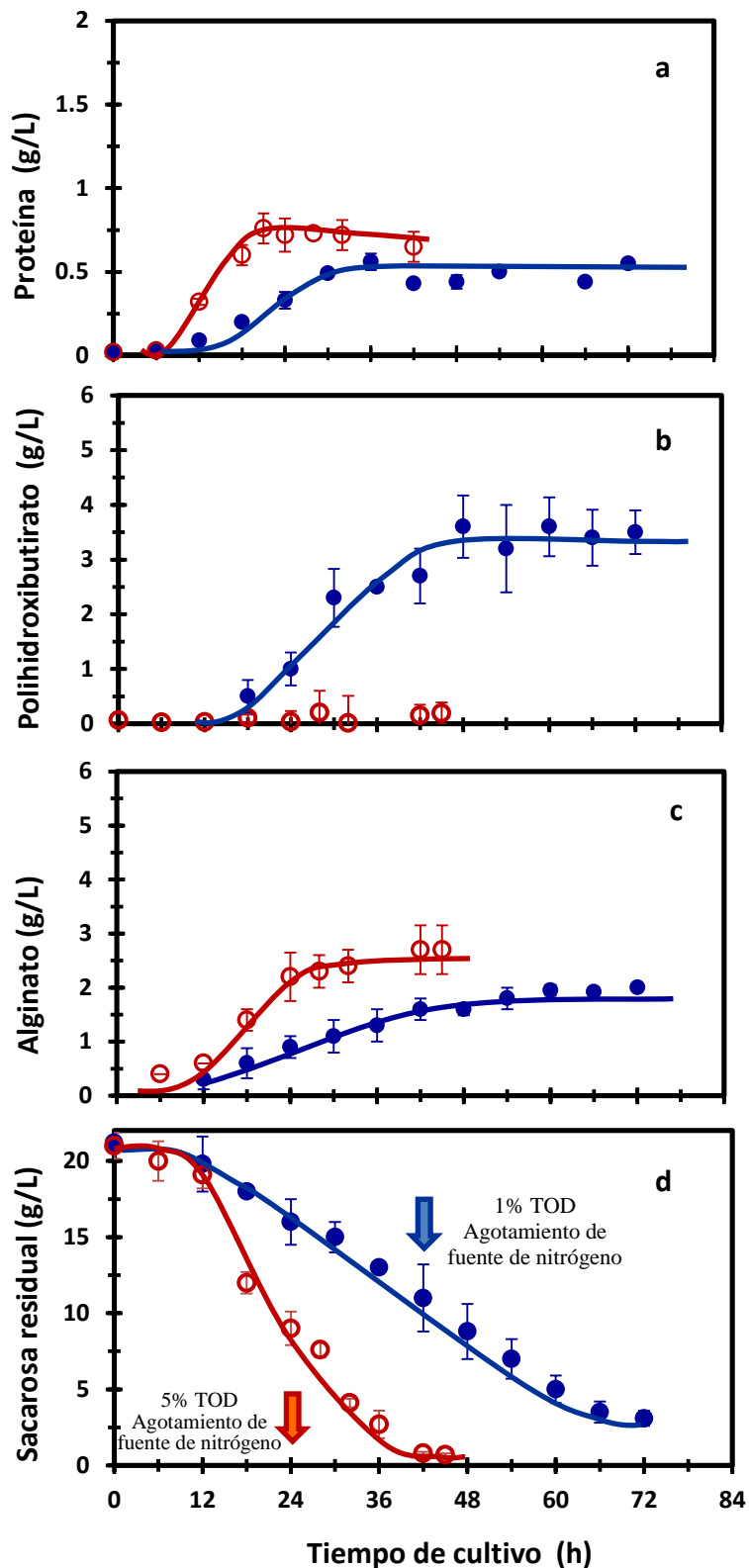


Figura 6.2. Crecimiento celular como contenido de proteína (a), producción de polihidroxi butirato (b), producción de alginato (c) y consumo de sustrato (d) en cultivos *de A. vinelandii* a 1 (●) y 5 % (○) de TOD y a condiciones controladas de temperatura (29°C), pH (7.2) y agitación (500 rpm). Las flechas indican el tiempo de cultivo en el que la fuente de nitrógeno proporcionada en el medio de cultivo se agotó.

La producción específica de alginato en base a la biomasa residual (biomasa cuantificada por peso seco menos el PHB producido), fue dos veces más alta en los cultivos a 5 % de TOD, respecto de los correspondientes a 1 % (tabla 6.1).

En cuanto al consumo de sustrato, las cinéticas de la figura 6.2d muestran que la velocidad del consumo del sustrato se incrementó significativamente al incrementarse la TOD en el cultivo, presentando velocidades de 0.28 g_{sacarosa}/h y 0.54 g_{sacarosa}/h para los cultivos a 1 % y 5 % de TOD, respectivamente. La velocidad de consumo específico de la sacarosa en base a la biomasa residual en cultivos a 5 %, de TOD fue 1.6 veces más alta que el observado en cultivos a 1 % de TOD (tabla 6.1). Además, destaca que al final de los cultivos desarrollados a 1 %, la sacarosa remanente en los caldos fue de 3.5 g/L, mientras que en los cultivos desarrollados a 5 %, la sacarosa se detectó en concentraciones mínimas (se cuantificaron 0.3 g/L) (figura 6.2d). A diferencia de la productividad, el rendimiento de producción de alginato (en base a biomasa residual) de los cultivos fueron similares (1.18 y 1.5 g_{alginato}/g_{biomasa residual} para el cultivo desarrollado a 1 y 5 % de TOD, respectivamente) (tabla 6.1). Estos rendimientos son similares a los reportados por otros autores en otros medios de cultivo (Peña *et al.*, 2000).

Tabla 6.1.- Parámetros cinéticos de los cultivos, en función del oxígeno disuelto.

TOD (%)	μ (h ⁻¹)	Rendimiento (g _{alginato} /g _{biomasa residual})	Vel. específica prod. alginato (g _{alginato} /g _{biomasa residual h})	Vel. específica de consumo de sacarosa (g _{sacarosa} /g _{biomasa residual h})
1	0.08	1.18	0.021	0.14
5	0.17	1.5	0.049	0.23

Biomasa residual: biomasa libre de PHB.

6.1.3. Consumo de oxígeno y producción de CO₂ en cultivos de *A. vinelandii* a TOD de 1 y 5 %.

En los cultivos desarrollados a alta TOD, la producción de CO₂ se incrementó significativamente (figura 6.3). Los procesos presentaron una producción máxima de CO₂ de 9 y 29 mmol/L h para los cultivos a 1 y 5 % de TOD (figura 6.3). En los cultivos desarrollados a 1 %, las máximas

producciones de CO₂ se presentaron a las 32 h y se mantuvieron hasta las 58 horas de cultivo. En los cultivos desarrollados a 5 % de TOD, la máxima producción de CO₂ se alcanzó desde las 12 h de cultivo y se mantiene en su nivel máximo y estable (“plateau”) hasta las 34 horas de cultivo (figura 6.3). Sin embargo, comparando el crecimiento y la producción de alginato a las 24 h, tiempo en el que ambos parámetros han alcanzado los niveles máximos de producción (figura 6.2a y 6.2c) y además, la producción de PHB es mínima, el consumo de sustrato (que en ese tiempo se encuentra presente en un 40 %) continúa hasta prácticamente agotarse, y observándose una alta producción de CO₂ (figura 6.3). Esta alta producción de CO₂ en los cultivos desarrollados a 5 % de TOD indica, por un lado, que la bacteria canalizó una mayor proporción de la fuente de carbono hacia el ciclo de los ácidos tricarbóxicos, donde se consumen los intermediarios de glucosa y fructosa durante la respiración bacteriana. En *A. vinelandii*, éste es un mecanismo mediante el cual, la célula remueve el oxígeno del citoplasma, incrementando su respiración (Setubal *et al.*, 2009).

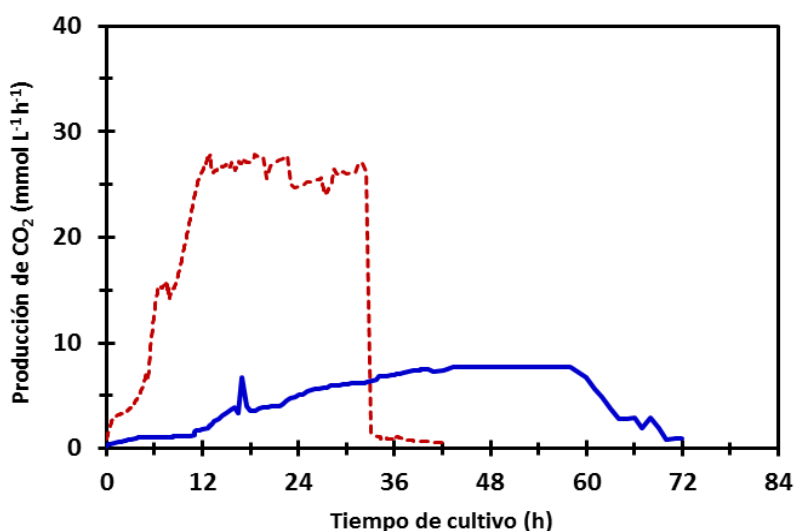


Figura 6.3. Producción de CO₂ (cuantificado en el venteo del biorreactor) en cultivos de *A. vinelandii* cultivada a TODs de 1 y 5 %. Leyendas: Símbolo TOD (%)

—	1
- - -	5

Por otro lado, el sustrato metabolizado que la bacteria no canalizó hacia la producción de biomasa o polisacárido es también utilizado hacia el mantenimiento celular. Sabra y colaboradores encontraron que al cultivar *A. vinelandii* (DSM 53941b) a diferentes TOD's (de 1 a

10 %) y en cultivos continuos, el consumo de azúcar requerido para el mantenimiento de la bacteria se incrementa importantemente al incrementarse la TOD en el cultivo, incrementándose de 0.3, 0.8 y 1.2 $\text{g}_{\text{sacarosa}}/\text{g}_{\text{biomasa}}\cdot\text{h}$ en cultivos realizados a 1, 5 y 10 % de TOD, respectivamente y comparados a una misma velocidad de crecimiento (0.08 h^{-1}) (Sabra *et al.*, 1999). Por lo anterior, no se descarta que en los cultivos a 5 %, la fuente de carbono se canalizó, en mayor proporción, hacia mantenimiento celular con respecto a lo requerido en los cultivos desarrollados a 1 %.

La respiración y oxidación de la fuente de carbono son mecanismos que *A. vinelandii* utiliza para proteger su sistema nitrogenasa del oxígeno presente en el ambiente (denominado protección respiratoria) (Oelze, *et al.*, 2000; Setubal *et al.*, 2009). En el presente proyecto, el consumo de la fuente de nitrógeno (proporcionada como amonio) presentó diferencias importantes en función de la TOD del cultivo, agotándose a las 42 y a las 24 horas para los cultivos desarrollados a 1 y 5 % de TOD (figura 6.2d). Es probable que una vez agotado el amonio proporcionado en el medio de cultivo, la bacteria realizara el proceso de fijación de nitrógeno (considerando que nitrógeno gaseoso fue suministrado en el cultivo para el control de la TOD). Como se observa en la figura 6.2d, en el tiempo de cultivo cuando el nitrógeno suministrado en el medio (como amonio) se agotó, la fuente de carbono estaba presente en al menos un 40 % de la concentración inicial proporcionada (para las dos condiciones de TOD). De acuerdo a lo anterior, es probable que la fuente de carbono haya sido utilizada en la fijación de nitrógeno (proceso altamente demandante de energía) y en el caso del cultivo al 5% de TOD, la alta producción de CO_2 probablemente se realizó como mecanismo de protección del sistema nitrogenasa.

Debido a la importancia del oxígeno en las actividades metabólicas, la velocidad de transferencia de oxígeno ha sido un parámetro muy utilizado para analizar el estado fisiológico en cultivos aeróbicos (Anderlei y Buchs, 2001). Por ello, en los cultivos se calcularon las velocidades de transferencia de oxígeno (VTO) y las velocidades de consumo de oxígeno (VCO) (de acuerdo a como se describe en la sección 5.4.10) y el coeficiente respiratorio (CR). Como se muestra en la tabla 6.2, la TOD influyó importantemente sobre la actividad metabólica de la bacteria. Las VCO_{max} fueron de 19 y 42 $\text{mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para los cultivos desarrollados a 1 y 5 %, respectivamente. Los procesos presentaron diferencias en la velocidad específica de consumo de oxígeno ($q\text{O}_2$) las cuales fueron de 36 y 56 $\text{mmol g}_{\text{proteína}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para los cultivos desarrollados a 1 y 5 % de TOD (tabla 6.2). La alta VCO observada en el cultivo a 5 % son debidas a la mayor producción de alginato y al mayor rendimiento en la producción de alginato en estos cultivos (figura 6.1c y tabla

6.2). Se sabe que durante la biosíntesis de alginato el metabolismo respiratorio de la bacteria se incrementa debido a una mayor actividad de las enzimas involucradas en el ciclo de los ácidos tricarbónicos, generando una mayor producción de poder reductor para la síntesis de ATP, el cual es necesario para la síntesis de alginato, y es demandante de energía (Jarman y Pace, 1984). Por otro lado, las bajas VTO (VCO) han sido relacionados a la producción de alginato de alto PM (Díaz Barrera *et al.*, 2007; Lozano *et al.*, 2011), como también se encontró en este trabajo en el cultivo a 1%, y que se describe en la siguiente sección.

Los coeficientes respiratorios fueron de 0.47 y 0.71 para los cultivos desarrollados a 1 y 5 % de TOD (tabla 6.2). El CR de 0.71 determinado en los cultivos a 5% de TOD, donde se produjo la más alta concentración de alginato, es cercano al CR teórico máximo que es de 0.8, calculado a partir de la estequiometría de las reacciones metabólicas involucradas en la síntesis de alginato a partir de sacarosa (Sabra *et al.*, 1999), así como a los valores experimentales reportados por Sabra *et al.*, (1999). Sabra y colaboradores (1999) reportaron coeficientes respiratorios de 0.80-0.84 en cultivos continuos de *A. vinelandii* (DSMZ 93-541b) desarrollados a TODs de 3-5% (e independientemente de la velocidad de dilución), condiciones en las que se ha demostrado, se favorece la producción de alginato (Sabra *et al.*, 199). El CR observado en el cultivo a 1% de TOD de 0.47, contrasta con lo reportado por Sabra *et al.*, (1999) quienes reportaron valores mayores a la unidad en cultivos desarrollados a 1% de TOD y fueron atribuidos a la producción de PHB. Sin embargo, el CR de la bacteria cultivada a 1% de TOD, es similar con los CRs reportados por Castillo (2013) para cultivos continuos desarrollados con la misma cepa a 1% de TOD e independientemente de la velocidad de dilución (D), excepto que Castillo cultivó la bacteria en condiciones diazotróficas y con glucosa. Castillo (2013) reportó CRs de 0.57, 0.61, 0.63 y 0.50 para velocidades de crecimiento de 0.02, 0.04, 0.06 y 0.08 h⁻¹ condiciones en las que la producción de PHB se favoreció.

Tabla 6.2. Velocidad de consumo de oxígeno, velocidad específica de consumo de oxígeno y coeficiente respiratorio en cultivos de *A. vinelandii* desarrollados a 1 y 5 % de TOD.

TOD (%)	VCO (mmol L ⁻¹ h ⁻¹)	qO ₂ (mmol g _{proteína} ⁻¹ h ⁻¹)	CR
1	19	36	0.47
5	42	56	0.71

6.2. Peso molecular promedio del alginato en función de la TOD

Como se observa en la figura 6.4a, a una baja TOD se generó alginato de alto peso molecular. En los cultivos a 1 %, el PM del polímero fue de 1200 ± 235 kDa. A 5 % de TOD, no rebasó los 42 ± 12 kDa (figura 6.4a). Las figuras 6.4a y 6.4b muestran que desde el inicio del cultivo, la bacteria produjo un alginato de peso molecular significativamente diferente. Como se observa en la figura 6.4b, entre las 12 y las 18 h de cultivo se inició la producción de alginato en las dos condiciones evaluadas, y el peso molecular del alginato fue significativamente diferente (de 560 y 42 kDa para 1 y 5 % de TOD, respectivamente) (figura 6.4a). Además, la evolución de los perfiles de PM para cada condición de TOD, mostró diferencias muy importantes durante el cultivo. En cultivos desarrollados a 1 % de TOD, se observó una etapa en la que el PM se incrementó (de las 18 a las 36 h de cultivo), posteriormente, el PM se mantuvo prácticamente constante hasta el final del cultivo. En el cultivo desarrollado a 5 % de TOD, el PM máximo ($42 \text{ kDa} \pm 12 \text{ kDa}$) se alcanzó desde las 18 horas y no se observaron cambios significativos en el PM durante el proceso de producción del polímero.

En la figura 6.5 se presenta la distribución de pesos moleculares del alginato producido en las dos condiciones de TOD evaluadas y su evolución a través del tiempo de cultivo. En los cultivos desarrollados a 5% de TOD, se observa que la distribución de los PM del polímero generado a 5 % presentó un desplazamiento hacia la región de bajo peso molecular, en la fase estacionaria de crecimiento (32 h), ocasionado por una disminución en el PM del polímero, generándose familias más dispersas. Este comportamiento se reflejó en el índice de polidispersión (IP) del polímero, el cual se incrementó de 1.7 a 3 con el transcurso del tiempo de cultivo. Un comportamiento contrario se observó en la distribución de los PM del polímero producido a 1 % de TOD, en donde se observa que la distribución de PM presentó un desplazamiento hacia la región de alto peso molecular con el transcurso del tiempo del tiempo de cultivo (figura 6.5), debido al incremento en el PM del polímero, además, el IP disminuyó de 7 a 4, lo cual sugiere por una lado, que la polimerización está efectuándose de forma constante durante el proceso de producción del polímero, por otro lado, en esta condición de TOD, no se presentó depolimerización significativa del alginato.

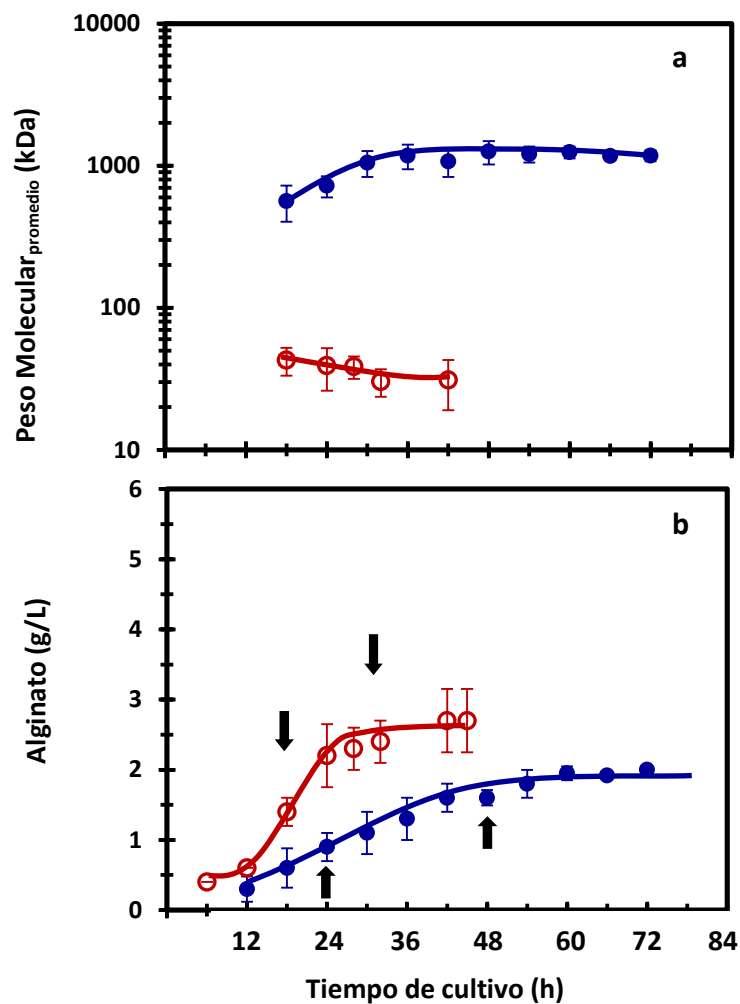


Figura 6.4. Peso molecular promedio (a) y producción de alginato (b) por *A. vinelandii* cultivada a 1 (●) y 5 % (○) de TOD y a condiciones controladas de temperatura (29°C), pH (7.2) y agitación (500 rpm). Las flechas indican los tiempos de muestreo en los que se realizaron los análisis de transcripción génica para cada una de las condiciones de TOD analizadas.

Los IP del polímero producido en los cultivos a 1 % de TOD son similares a los reportados por Trujillo-Roldán *et al.*, (2004) quienes reportaron IP en un rango de 4-6 para la misma cepa, cultivada en un medio complejo (con extracto de levadura) y a 1, 3 y 5% TOD.

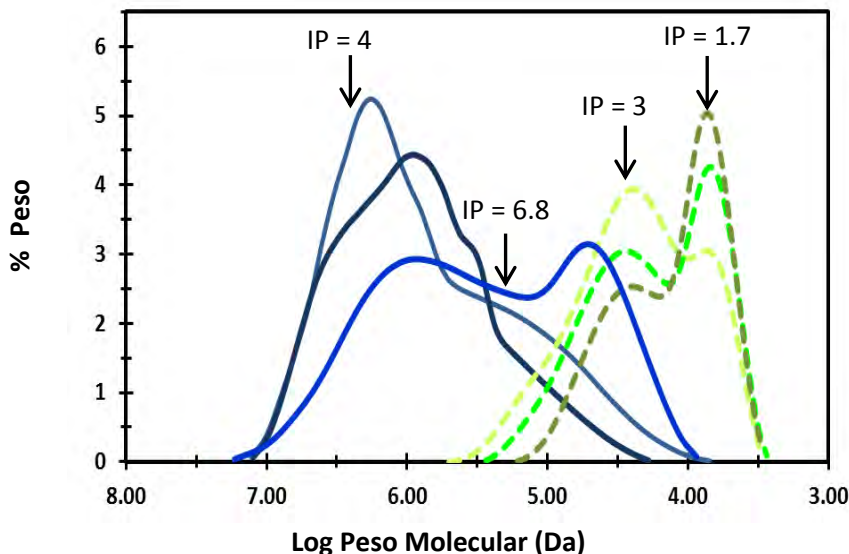


Figura 6.5. Distribución de los pesos moleculares e índice de polidispersión del alginato producido por *A. vinelandii* en función de la TOD y del tiempo de cultivo. Leyendas:

Cultivo a 1 %		Cultivo a 5 %	
—	24 h	—	18 h
—	48 h	—	32 h
—	72 h	—	42 h

Para entender el proceso mediante el que el oxígeno modificó el peso molecular del polímero, en la siguiente etapa se analizó la expresión de genes que codifican para las proteínas constituyentes del complejo alginato polimerasa y para las alginasas.

6.3. Expresión relativa de genes que codifican para proteínas constituyentes del complejo alginato polimerasa y para alginasas, en función del oxígeno disuelto.

6.3.1. Expresión relativa de genes constituyentes del complejo alginato polimerasa

Los resultados de la expresión génica en los cultivos, fueron normalizados tomando como referencia la expresión génica de los cultivos desarrollados a 5 % de TOD (denominado cultivo referencia). Se evaluaron dos fases de crecimiento, la fase exponencial y la fase estacionaria; los resultados para cada una de ellas fueron normalizados con su respectivo cultivo referencia, en

cada fase de crecimiento. Como se observa en la figura 6.6a y 6.6b, la expresión de los genes del complejo alginato polimerasa (*alg8* y *alg44*) fue significativamente más alta en los cultivos a 1 % de TOD, condición en la que se generó un alginato de alto peso molecular (1200 kDa, figura 6.4a), tanto en fase exponencial como en fase estacionaria (a las 24 y 48 horas de cultivo). En la fase exponencial, la expresión de *alg8*, *alg44* y *algX* fue de 6.8, 4 y 6.9, respectivamente (figura 6.6a). En la fase estacionaria la expresión de estos genes fue más baja: 3.1, 3.8 y 3.5, respectivamente (figura 6.6b); sin embargo, su expresión fue mayor a la observada en el cultivo referencia (5 % TOD). Destaca que a pesar de que *algX* puede transcribirse de un promotor diferente al que dirige la transcripción de *alg8* y *alg44*, los incrementos en la expresión relativa de *algX*, fueron similares a los correspondientes incrementos de expresión relativa observada en los genes del complejo alginato polimerasa (*alg8* y *alg44*), en las dos etapas de cultivo evaluadas. Lo anterior permite suponer que, en *A. vinelandii*, los procesos de polimerización y transporte del polímero a través del espacio periplásmico son concomitantes.

La mayor expresión relativa de los genes *alg8* y *alg44*, a baja TOD, donde se sintetizó alginato de alto peso molecular, confirma la participación de los productos de estos genes en la polimerización del alginato.

En cuanto al análisis de la transcripción de los genes constituyentes del complejo alginato polimerasa, en la literatura sólo se ha analizado la transcripción de *alg8*, en cultivos sin control de TOD. Para *alg44* no se había analizado la influencia de la TOD sobre su transcripción, a pesar de las características y el papel esencial que tiene la proteína en la polimerización del alginato. Alg44 es una proteína de membrana citoplásmica anclada a membrana que presenta un dominio PilZ para la unión de c-di-GMP (3',5'-diguanilato cíclico) que se requiere para la biosíntesis del alginato (Hay *et al*, 2009). El c-di-GMP se ha ligado a respuestas fisiológicas como la producción de exopolisacáridos, movilidad, formación de *biofilms* y la formación de organelos de adhesión a superficies (Jenal y Malone, 2006; Pasavento y Hengge, 2009).

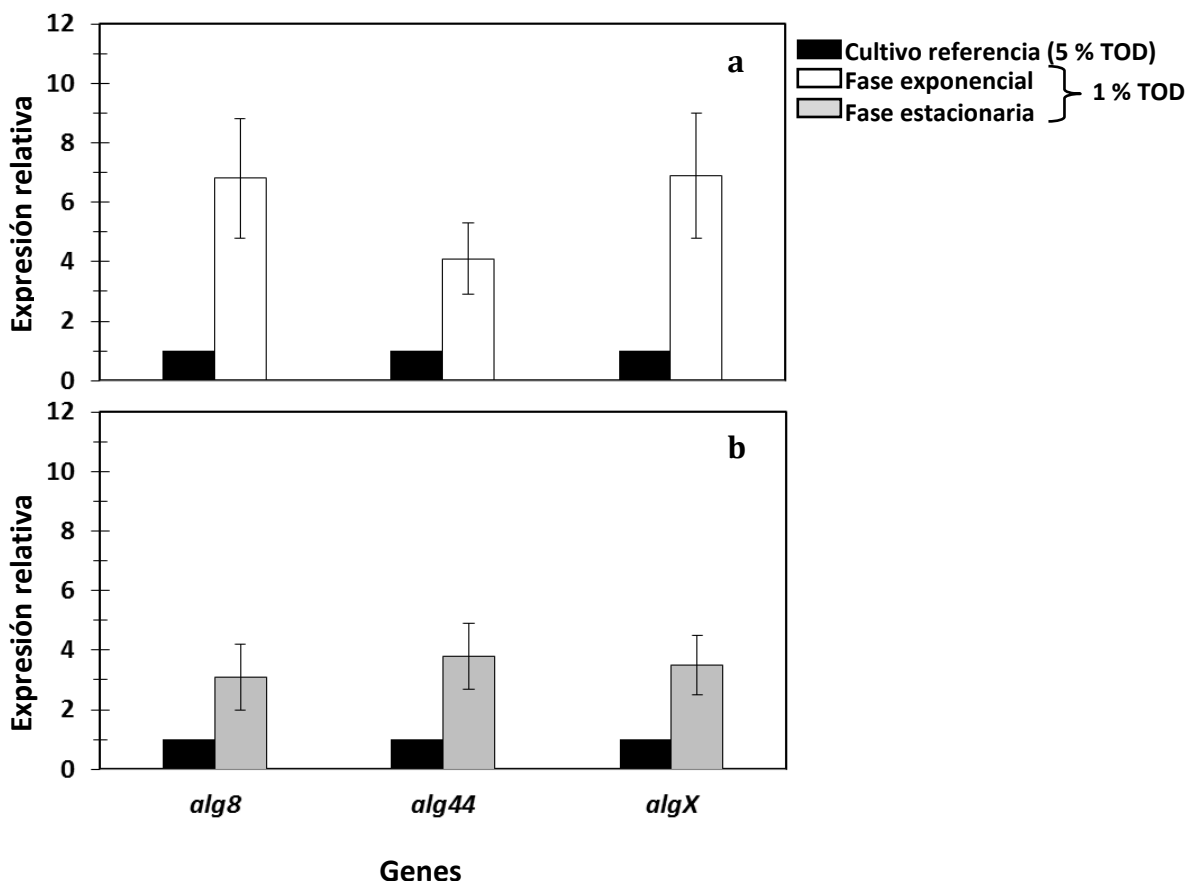


Figura 6.6. Expresión relativa de *alg8*, *alg44* y *algX* en fase exponencial (a) y en fase estacionaria (b) de crecimiento de *A. vinelandii* cultivada a tensiones de oxígeno disuelto de 1 % y 5 %. El análisis de transcripción en fase exponencial se realizó a las 24 y 18 h para los cultivos desarrollados a 1 % y 5 % de TOD, respectivamente; en fase estacionaria el análisis se realizó a las 48 y 32 h para los cultivos a 1 y 5 % de TOD, respectivamente.

Recientemente se reportó que la biosíntesis del alginato en *P. aeruginosa* es regulada por MucR, a través de la generación de la poza de cdi-GMP, que es esencial para la biosíntesis de alginato, el cual se une al dominio PilZ de Alg44. MucR es una proteína que contiene un dominio MHYT que responde a condiciones ambientales como el oxígeno, un dominio GGDEF común en diguanilato ciclasas (enzimas que sintetizan cdi-GMP) y un dominio EAL, dominio conservado en fosfodiesterasas, enzimas que hidrolizan cdi-GMP (figura 6.7a). La activación de una u otra actividad depende de la señal ambiental que la bacteria sensa. En el caso del oxígeno, se ha reportado que en condiciones microaerófilas se activa el dominio diguanilato ciclasa, que sintetiza cdi-GMP, mientras que a niveles de oxígeno alto, se activa el dominio fosfodiesterasa, enzima que hidroliza cdi-GMP (Hay *et al.*, 2009; Jenal y Malone, 2009; Chan *et al.*, 2001).

De acuerdo a los resultados del presente proyecto y a información reportada en la literatura, se sugiere que el alto PM del alginato producido a baja TOD es debido a la alta actividad de la polimerasa Alg8 y Alg44. Para Alg44 se propone que en los cultivos desarrollados a 1 % de TOD, se incrementa el c-di-GMP, por una proteína de *A. vinelandii* homóloga a MucR, tal como fue reportado para *P. aeruginosa* (Hay *et al.*, 2009). De acuerdo a lo anterior, en la figura 6.7 se esquematiza el modelo mencionado y derivado de los resultados de la presente investigación, para la regulación de la actividad polimerasa de Alg44 en función de la TOD en el cultivo en *A. vinelandii*, a través de una proteína homóloga a MucR de *P. aeruginosa*. Sin embargo, es importante mencionar que se requiere de estudios más específicos para analizar estos aspectos.

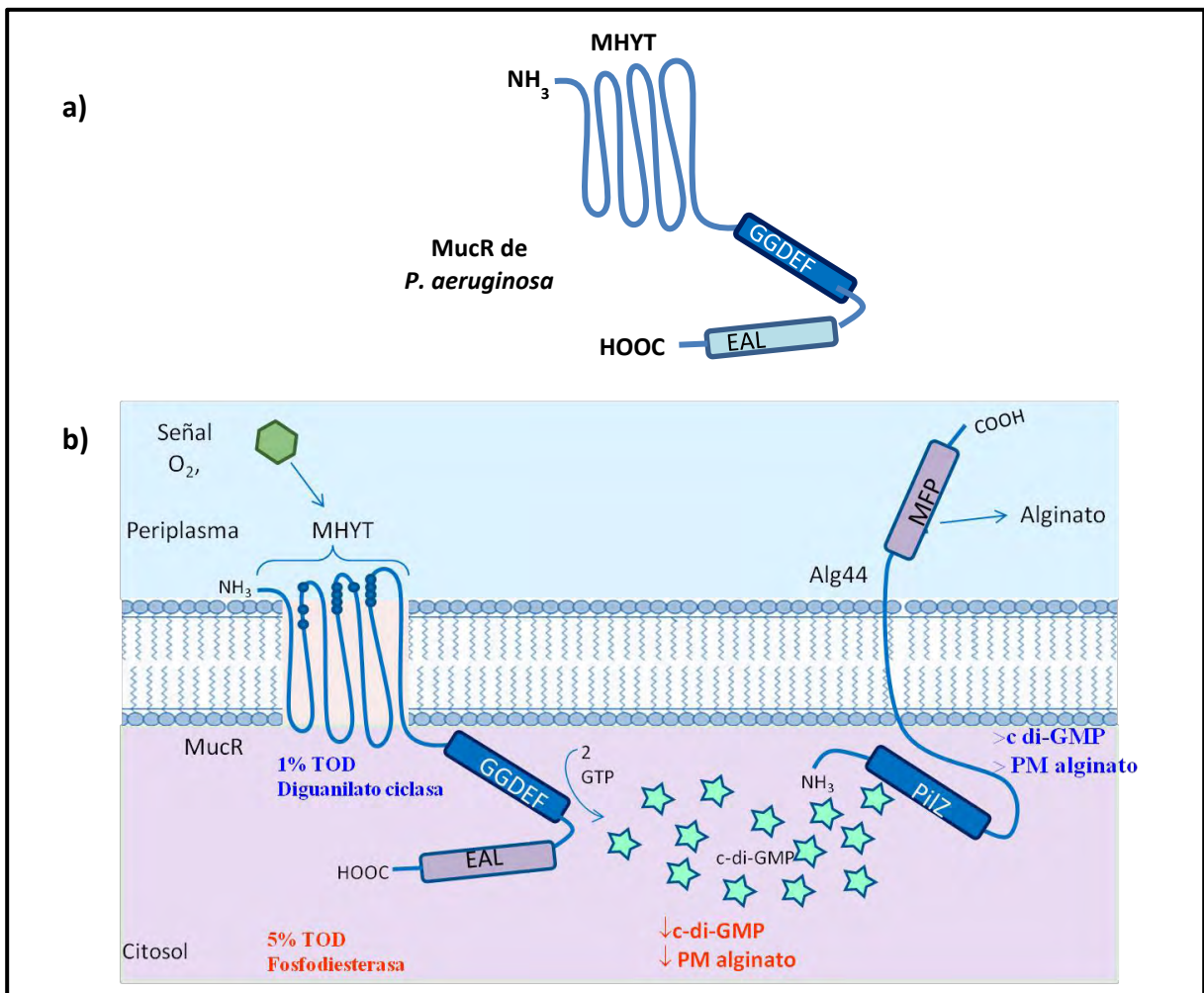


Figura 6.7. a): Representación de los dominios presentes en MucR de *P. aeruginosa*. El dominio GGDEF está involucrado en la síntesis de c-di-GMP, el dominio EAL hidroliza c-di-GMP. El dominio MHYT detecta señales ambientales como oxígeno. b): Modelo propuesto con derivado de los resultados de la presente investigación, para la regulación de la actividad polimerasa de Alg44 en función de la TOD en el cultivo en *A. vinelandii*, a través de una proteína homóloga a MucR de *P. aeruginosa*. Adaptado de Hay *et al.*, 2009.

6.3.2. Expresión relativa de genes que codifican para alginasas

En cuanto a la expresión relativa de genes que codifican para alginasas, la TOD modificó la expresión tanto de las alginasas intracelulares como de las extracelulares (figura 6.8). En el caso de los genes codificantes para las alginasas intracelulares, en los cultivos a 1 % de TOD se observó una mayor expresión de *algL* y *alyA2*, con respecto a lo obtenido en el cultivo referencia (5 % de TOD), en las dos etapas de cultivo analizadas. La expresión de *alyA1* en la fase exponencial fue 60 % menor que lo observado en el cultivo de referencia (5 % de TOD) y en la fase estacionaria no se expresó. Se desconoce la función biológica *alyA1*. En el caso de *alyA2*, Gimmetstad y colaboradores (2009) reportaron que es indispensable para el crecimiento vegetativo de *A. vinelandii*.

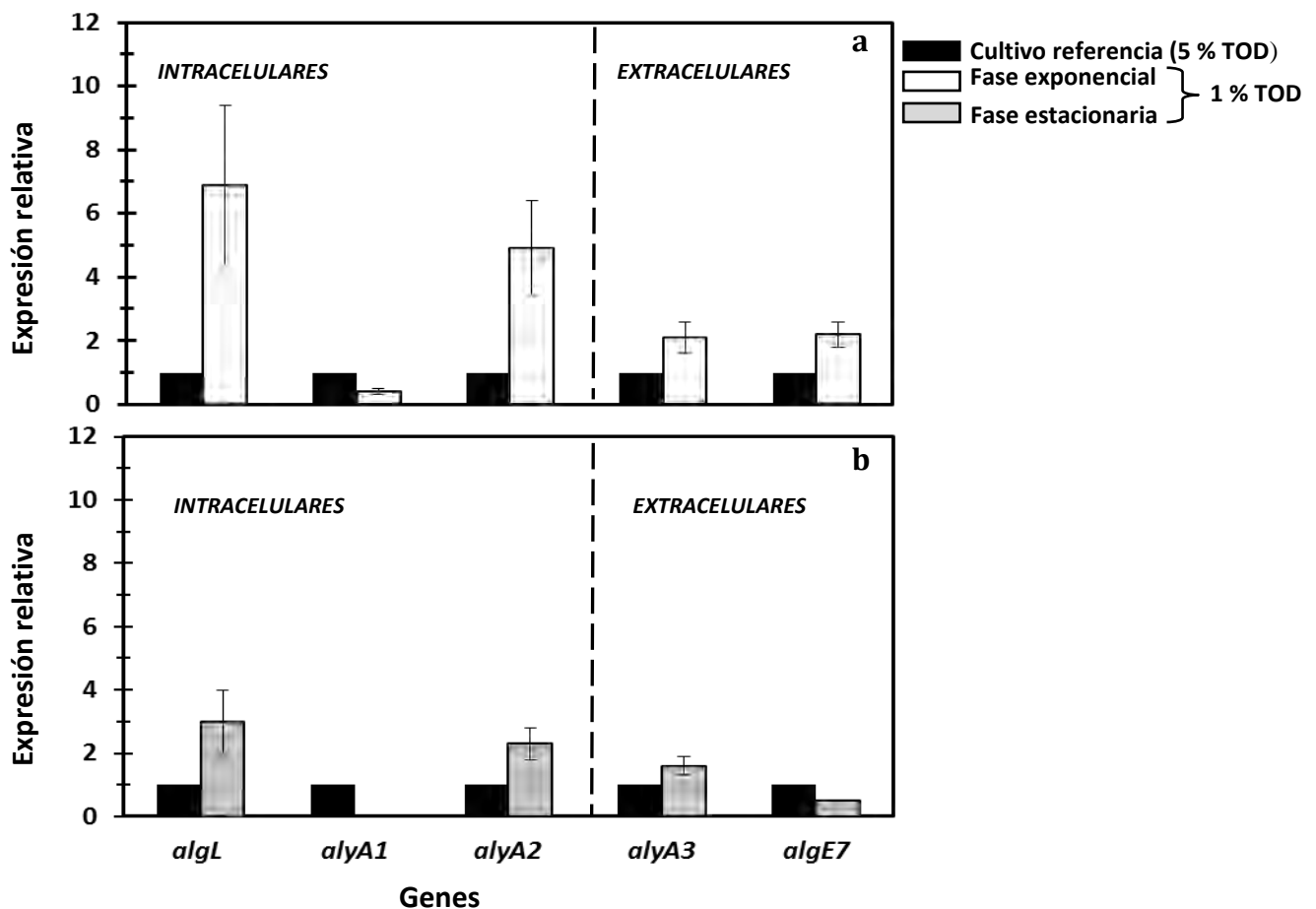


Figura 6.8. Expresión de genes que codifican para alginasas en *A. vinelandii*, en función de la TOD del cultivo en fase exponencial (a) y en fase estacionaria (b). Los tiempos de muestreo en la fase exponencial fueron: 24 y 18 h para 1 y 5 % de TOD, respectivamente; para la fase estacionaria fueron: 48 y 32 h para 1 y 5 % de TOD, respectivamente.

La expresión relativa de *algL* en cultivos a 1 % de TOD fue de 6.9 y 3 veces (en fase exponencial y estacionaria, respectivamente) (figura 6.8), con respecto de lo obtenido en cultivos a 5 % de TOD, en sus respectivas fases de crecimiento evaluadas. Estos incrementos fueron similares a lo observado con los genes del complejo polimerasa, cuando se produce alginato de alto PM (en cultivos a 1 % de TOD) y con la expresión relativa del gen *algX*. La similitud en los niveles de expresión relativa entre estos genes, probablemente esté ligada a funciones importantes de AlgL vinculadas al proceso de polimerización y transporte del polímero en periplasma. En *P. aeruginosa*, se ha reportado la participación de AlgL como subunidad del complejo de transporte del polímero por el espacio periplásmico (Jain and Ohman, 2005). Por su parte, Bakkevig *et al.*, (2005) demostraron la participación de AlgL en la degradación de alginato que no fue exportado del periplasma de *P. aeruginosa*. Además, considerando las funciones de los productos de los genes *algL* y *algX* en protección y transporte del polímero; y la similitud que presentaron sus expresiones relativas con las correspondientes de los genes del complejo alginato polimerasa, en las dos etapas de cultivo, sugiere la importancia de cada una de la proteína correspondiente y de su actividad, para que exista una coordinación entre el proceso de polimerización y transporte del alginato. Por ejemplo, Oglesby *et al.*, (2008) observaron una coordinación entre la polimerización y la excreción del alginato producido por *P. aeruginosa*, mediante análisis por *Western blot*, al evaluar una cepa mutante en *alg44* observaron una reducción en AlgE (la porina de membrana de la bacteria), mientras que la expresión de *alg44* restableció los niveles de AlgE.

Respecto de los genes que codifican para alginasas extracelulares, en la figura 6.8a se observa que en cultivos a baja TOD (1 %), tanto *alyA3* como *algE7*, tuvieron una expresión mayor (dos veces) en fase exponencial, respecto de su nivel de expresión en cultivos a 5 % de TOD. En fase estacionaria (figura 6.8b), la expresión relativa de *alyA3* fue 60% más alta, mientras que la de *algE7* fue un 50% más baja, con respecto a lo observado en el cultivo referencia (a 5 % de TOD). El incremento en la expresión de estos genes codificantes para alginasas resultó contradictorio en relación al alto PM del alginato sintetizado en estos cultivos. Por lo anterior, fue indispensable el análisis de la actividad alginasa durante los cultivos.

6.4. Actividad alginasa en función de la TOD en cultivos de *A. vinelandii* desarrollados a 1 % y 5 % de TOD.

La actividad alginasa intracelular cuantificada en los cultivos de *A. vinelandii* desarrollados a 1 % y 5 % de TOD fue similar (figura 6.9a). En los cultivos desarrollados a 1 % de TOD, la actividad alginasa intracelular permaneció constante (alrededor de 0.015 U/mg_{proteína}) durante las primeras 48 horas de cultivo y, posteriormente, se presentó una disminución hasta un nivel indetectable al final del cultivo (figura 6.9a). Es probable que la baja actividad alginasa intracelular, sea requerida sólo para actividades indispensables para la célula. En *P. aeruginosa* se ha reportado que la actividad de la alginasa intracelular AlgL, es indispensable para la degradación de alginato que no fue excretado al ambiente extracelular (Jain and Ohman, 2005), además de su participación en protección y transporte del polímero a través del espacio periplásmico.

En los cultivos desarrollados a 5 % de TOD, se presentó un ligero incremento de la actividad de las 24 a las 36 horas de cultivo (figura 6.9a), sin embargo, el incremento observado no fue estadísticamente significativo. Después de las 36 horas de cultivo, se observó una disminución de la actividad alginasa intracelular (figura 6.9a).

La actividad alginasa extracelular se favoreció importantemente en el cultivo desarrollado a 5 % de TOD (figura 6.9b). En el periodo de las 12 a las 18 h de cultivo, la actividad fue similar para ambas condiciones evaluadas (1 y 5 % de TOD) (figura 6.9b). Después de este tiempo, en los cultivos a 5 % de TOD se presentó un incremento importante de la actividad, alcanzando una actividad máxima de 0.05 U/mg_{proteína} a las 32 h de cultivo. Esta actividad fue cinco veces mayor respecto de la observada en los cultivos a 1 % de TOD (figura 6.9b). Posteriormente, se observó una disminución de la actividad. En contraste, en los cultivos desarrollados a 1 % de TOD, la actividad alginasa extracelular se mantuvo en un valor menor a 0.01 U/mg_{proteína}, durante todo el proceso de cultivo.

El incremento en la actividad alginasa extracelular en fase estacionaria de crecimiento y en esta misma bacteria fue reportado previamente por Trujillo-Roldán *et al.*, (2004); sin embargo, las actividades específicas reportadas difieren importantemente. Trujillo-Roldán *et al.*, (2004) reportaron una actividad específica máxima de 1.2 U/mg_{proteína} en un medio de cultivo complejo,

constituido por extracto de levadura como fuente de nitrógeno. En el presente proyecto la máxima actividad específica fue 24 veces menor ($0.05 \text{ U/mg}_{\text{proteína}}$). Se sabe que el extracto de levadura es un nutriente que favorece la actividad alginasa, de hecho un medio de cultivo compuesto por este nutriente ha sido recientemente patentado (Weiner *et al.*, 2008).

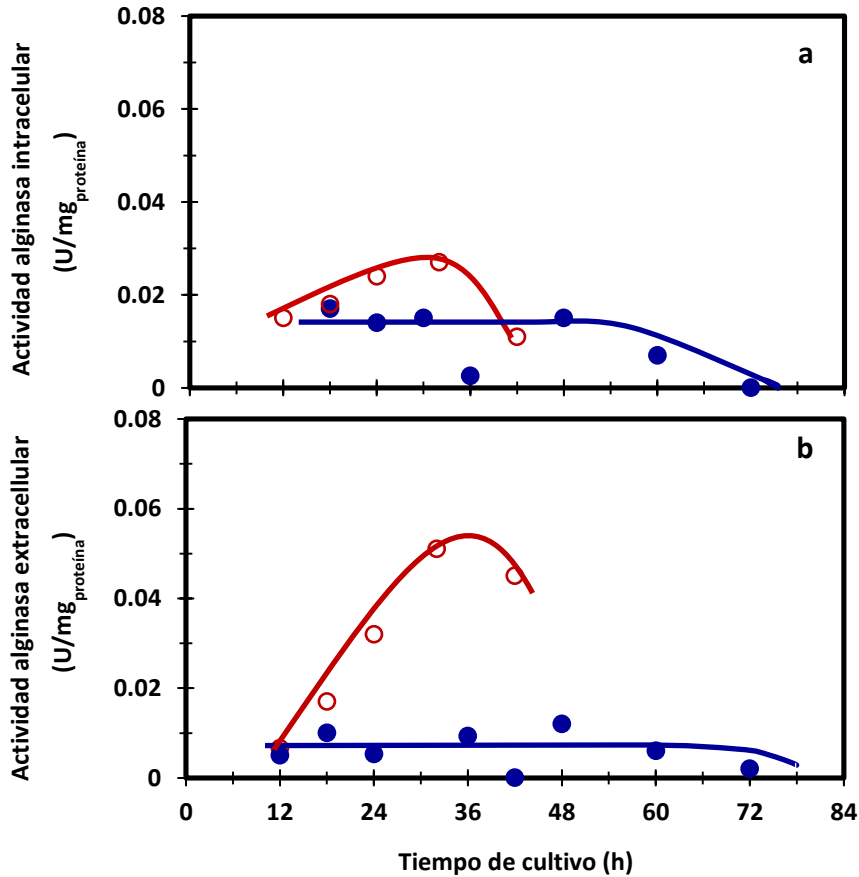


Figura 6.9. Actividad alginasa intracelular (a) y extracelular (b) en cultivos de *A. vinelandii* desarrollados a 1 (●) y 5 % (○) de TOD y agitación constante de 500 rpm.

La influencia de la TOD sobre la transcripción de genes involucrados en la biosíntesis de alginato (*algA*, *algC* y *algD*) por *P. aeruginosa* y sobre la actividad de sus productos fue reportado por previamente por Leitao y Sã correia (1997), quienes sugirieron una regulación postranscripcional sobre *algC* y *algD*. La discrepancia entre la transcripción de los genes que codifican para alginasas y la actividad alginasa encontrada en el presente estudio puede

explicarse por una posible regulación postranscripcional, como se reportó recientemente para *algD* en *A. vinelandii* (Manzo *et al.*, 2011).

Por otro lado, Seañez *et al.*, (2001) reportaron que altas concentraciones de CO₂ (suministrado al biorreactor) en el cultivo de *A. vinelandii* inhibían la actividad alginasa extracelular; sin embargo, los resultados del presente trabajo difieren de esa observación ya que en los cultivos desarrollados a 5 % TOD, donde se favoreció la actividad alginasa extracelular, estuvo presente una mayor concentración de CO₂ (figura 6.3 y 6.9b).

Hasta antes del presente proyecto, la diferencias encontradas en el peso molecular del alginato producido por *A. vinelandii* en función de la TOD habían sido principalmente atribuidas a diferencias en la actividad alginasa extracelular (Peña *et al.*, 2000; Trujillo-Roldán *et al.*, 2004). Sin embargo, a la luz de los nuevos resultados generados en el presente proyecto, en donde se incluye el análisis tanto de la actividad alginasa intracelular como de la extracelular, es posible inferir que la actividad polimerasa se favorece a baja TOD y es la que principalmente está determinando el PM del alginato.

En estudios previos (Trujillo-Roldán *et al.*, 2004), se analizó el PM del alginato producido por la cepa silvestre de *A. vinelandii* ATCC9046 (la misma utilizada en el presente proyecto) y la actividad alginasa extracelular en función de la TOD. Los autores encontraron que durante las primeras 15 h de cultivo el peso molecular del alginato alcanzó un máximo de 1200 kDa, observándose una ligera disminución a 1000 kDa en la etapa final del cultivo (30 h). Es interesante señalar que el peso molecular máximo del polímero se obtuvo, aun cuando la actividad alginasa extracelular alcanzó su máximo valor (1.2 U/mg_{proteína}); actividad 24 veces mayor a la determinada en el presente estudio. Los datos anteriores son consistentes con la propuesta de la presente investigación que sugiere que si bien, la actividad alginasa está presente durante todo el cultivo, el peso molecular del alginato está principalmente determinado por la actividad polimerasa, y que ésta se favorece a bajas tensiones de oxígeno disuelto.

Estudios previos han correlacionado la síntesis de alginato y su peso molecular con diferentes parámetros de cultivo. Por ejemplo, se ha reportado una relación inversa en la síntesis de alginato de alto peso molecular y la velocidad específica de crecimiento de la bacteria (Priego-Jiménez *et al.*, 2005). Así también, se ha observado que bajas tensiones de oxígeno disuelto (\leq

3%) y bajas velocidades de transferencia y consumo de oxígeno favorecen la síntesis de alginato de alto peso molecular (Trujillo-Roldán *et al.*, 2004; Díaz-Barrera *et al.*, 2007; Peña *et al.*, 2011). Se ha observado también una relación inversa entre la producción volumétrica y el peso molecular del polímero (Peña *et al.*, 2000; Trujillo-Roldán *et al.*, 2004).

La información anterior es congruente con el comportamiento observado en el presente estudio. Adicionalmente, en el presente trabajo se destaca que a una baja TOD (1%) se favorece la transcripción relativa de los genes del complejo alginato polimerasa. Además de que la actividad alginasa intra y extracelular se mantiene en un nivel basal durante todo el proceso de producción del alginato.

Además de lo anteriormente mencionado, no se descarta que el costo energético requerido por la bacteria para realizar las funciones de crecimiento y producción de metabolitos anteriormente mencionadas, sea menor cuando ésta se cultiva a baja TOD y le permita producir un polímero de mayor peso molecular (proceso que además requiere su transporte y secreción y que implican altos costos energéticos).

CAPITULO 7

CONCLUSIONES

Los resultados del presente proyecto demostraron que:

- La producción de alginato de alto peso molecular, en cultivos desarrollados a 1 % de TOD, está asociada a un incremento significativo en la expresión de los genes constituyentes del complejo alginato polimerasa *alg8* y *alg44*.
- La transcripción de *algX* fue más alta en cultivos a 1 % de TOD respecto de los cultivos a 5 % de TOD y simultánea con la transcripción de los genes constituyentes del complejo alginato polimerasa a 1 % de TOD (*alg8* y *alg44*).
- La transcripción de genes que codifican para alginasas fue más alta en cultivos a 1 % de TOD, respecto de su transcripción en cultivos a 5 % de TOD.
- En contraste, la actividad alginasa extracelular se favoreció en los cultivos desarrollados de 5 % de TOD. A diferencia, en los cultivos a 1% de TOD, tanto la actividad alginasa intracelular y extracelular, se mantienen en un nivel basal durante todo el proceso.
- La actividad alginasa extracelular no se afectó por las altas concentraciones de CO₂ producidas en el cultivo.

En *Azotobacter vinelandii*, la producción de alginato de alto peso molecular realizada a 1% de TOD, está asociada a una alta expresión de los genes del complejo alginato polimerasa (*alg8* y *alg44*) y a una probable alta actividad polimerasa; mientras que, la actividad alginasa intracelular y extracelular se mantienen en un nivel basal.

CAPITULO 8

PERSPECTIVAS

- Para conocer la expresión de las proteínas constituyentes del complejo alginato polimerasa (Alg8 y Alg44) en función del oxígeno, podrían realizarse fusiones traduccionales de la proteína fluorescente (GFP) con cada una de ellas.
- En el presente proyecto, en cultivos desarrollados a 1 % de TOD se favoreció la transcripción de los genes del complejo alginato polimerasa y con ello, la biosíntesis de alginato de alto peso molecular. Considerando que en *P. aeruginosa* la sobreexpresión de *alg8* incrementó la concentración del polímero, tendría potencial el diseñar una cepa en la que los genes *alg8* y/o *alg44* sean sobreexpresados, y evaluarla a baja TOD, como una estrategia para incrementar la producción de alginato de alto peso molecular

CAPITULO 9

PRODUCTOS GENERADOS

9.1. Artículo Publicado.- En el Anexo 1 se incluye el artículo que contiene los principales resultados del presente proyecto y que fue publicado en la **revista Enzyme and Microbial Technology**.

Flores, C., Moreno, S., Espín, G., Peña, C. and Galindo, E. Expression of alginases and alginate polymerases in response to oxygen, and their relationship with the alginate molecular weight in *Azotobacter vinelandii*. **Enzyme and Microbial Technology**. 2013, 53: 85–91.

9.2. Presentaciones en Congresos

1) Presentación oral: “Expresión de genes involucrados en la polimerización del alginato producido por *Azotobacter vinelandii*”. **Celia Flores**, Soledad Moreno, Daniel Segura, Carlos Peña y Enrique Galindo. **XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería**, Juriquilla, Querétaro, México. 19-24 de Junio de 2011.

2) Presentación de Cartel: “Alginase activity as a function of oxygen and its relationship with the alginate molecular weight in *Azotobacter vinelandii* cultures”. **Celia Flores**, Carlos Peña and Enrique Galindo. **XV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y 12th International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms**. Cancún, Quintana Roo, México. 24-28 de Junio de 2013.

CAPITULO 10

BIBLIOGRAFIA

- Amikam D. and Galperin M.Y. (2006). PilZ domain in part of the bacterial c-di-GMP binding protein. **Bioinformatics** 22(1): 3-6.
- Anderlei T. and Büchs J. (2001). Device for sterile online measurement of the oxygen transfer rate in shaking flasks. **Biochem Eng J** 7: 157-162.
- Bakkevig K., Sletta H., Gimmetstad M., Aune R., Ertesvåg H., Degnes K., Christensen B.E. and Valla S. (2005). Role of the *Pseudomonas* fluorescences alginate lyase (AlgL) in clearing the periplasm of alginates not exported to the extracellular environment. **J Bacteriol** 187(24): 8375-8384.
- Barry T, Geary S., Hannify S., MacGearailt C., Shalloo M., Heery D., Gannon F. and Powell R. (1992). Rapid mini-preparations of total RNA from bacteria. **Nucleic Acids Res** 20(18): 4940.
- Brivonese A. and Sutherland W. I. (1989). Polymer production by a mucoid strain of *Azotobacter vinelandii* batch culture. **Appl Microbiol Biotechnol** 30: 97-102.
- Castañeda M., Guzman J., Moreno S. and Espin G. (2000). The GacS sensor kinase regulates alginate and poly-beta-hydroxybutyrate production in *Azotobacter vinelandii*. **J Bacteriol** 182: 2624-2628.
- Castañeda M., Sánchez J., Moreno S., Núñez C. and Espín G. (2001) The global regulators GacA and σ^s form part of a cascade that controls alginate production in *Azotobacter vinelandii*. **J Bacteriol** 183(23): 6787-96793.
- Castillo Marenco T. (2013). La acetilación de los alginatos sintetizados por *Azotobacter vinelandii* en función de la tensión de oxígeno disuelto y de la velocidad específica de crecimiento. **Tesis de Doctorado**. Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Chan A., Tuckerman J. R., Gonzalez G., Mayer R. Weinhouse H., Volman, G. Amikan D., Benziman M. and Gilles-Gonzalez M.A. (2001). Phosphodiesterase A1, a regulator of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*, is a heme-based sensor. **Biochemistry** 40: 3420-3426.
- Clementi F. (1997). Alginate production by *Azotobacter vinelandii*. **Critical Rev in Biotechnol** 17(4): 327-361.
- Díaz-Barrera A., Peña C. and Galindo E. (2007). The oxygen transfer rate influences the molecular mass of the alginate produced by *Azotobacter vinelandii*. **Appl Microbiol Biotechnol** 76: 903-910.
- Díaz-Barrera A., Aguirre A., Berrios J. and Acevedo F. (2011). Continuous cultures for alginate production by *Azotobacter vinelandii* growing at different oxygen uptake rates. **Process Biochem** 46: 1879-1883.
- Díaz-Barrera A., Soto E. and Altamirano C. (2012). Alginate production and *alg8* expression by *Azotobacter vinelandii* in continuous cultures. **J Ind Microbiol Biotechnol** 39: 613-621

- Ertesvåg H. and Valla, S. (1998). Biosynthesis and applications of alginates. **Polym Degrad Stabil** 59: 85-91.
- Ertesvåg H., Erlien F., Skjåk-Bræk G., Rehm BHA. and Valla S. (1998). Biochemical properties and substrate specificities of a recombinantly produced *Azotobacter vinelandii* alginate lyase. **J Bacteriol** 180: 3779-3784.
- Ertesvåg H., Valla S. and Skjåk-bræk G. (2009). Enzymatic alginate modification. In *Alginates: Biology and Applications*. Rehm, B.H.A. (ed.). Berlin, Heidelberg, Germany: Springer Berlin Heidelberg, pp. 95-115.
- Espin G. (2002). Biología de *Azotobacter vinelandii*. En *Microbios en línea*. <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap6/>. Editores Martínez-Romero E. y Martínez-Romero JL. ISBN 968-36-8879-9.
- Franklin M.J. and Ohman D. E. (2002). Mutant analysis and cellular localization of the AlgI, AlgJ, and AlgF proteins required for O Acetylation of alginate in *Pseudomonas aeruginosa*. **J Bacteriol** 84(11): 3000-3007.
- Franklin M. J., Nivens D. E., Weadge, J. T. and Howell P. L. (2011). Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* extracellular polysaccharides, alginate, Pel, and Psl. **Frontiers in Microbiol**, 2: 1-15. doi: 10.3389/fmicb.2011.00167.
- Gaona G., Nuñez C., Goldberg J.B., Linford A.S., Nájera R., Castañeda M., Guzmán J., Espín G. and Soberón-Chávez G. (2004). Characterization of the *Azotobacter vinelandii* *algC* gen involved in alginate and lipopolysaccharide production. **FEMS Microbiol Lett** 238: 199-206.
- Gauri S. S., Santi M. M. and Pati B. R. (2012). Impact of *Azotobacter* exopolysaccharides on sustainable agriculture. **App Microbiol Biotechnol** 95 (2): 331-338.
- Galindo E., Peña C., Núñez C., Segura D. and Espin G. (2007). Molecular and bioengineering strategies to improve alginate and polyhydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii*. **Microb Cell Fact** 6, 7: 1-16.
- Gimmestad M., Ertesvåg H., Heggeset T., Aarstad O., Svanem B. and Valla S. (2009). Characterization of three new *Azotobacter vinelandii* alginate lyases, one of which is involved in cyst germination. **J Bacteriol** 191: 4845-4853.
- Hay ID, Remminghorst U. and Rehm BH. (2009). MucR, a novel membrane-associated regulator of alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. **Appl Environ Microbiol** 75: 1110-1120.
- Hay ID, Rehman Z. U., Moradal, M. F., Wang Y. and Rehm BH. (2013). Microbial alginate production, modification and its applications. **Microb Biotechnol** 6: 637-650.
- Horan NJ, Jarman TR. and Dawes EA. (1983). Studies on some enzymes of alginic acid biosynthesis in *Azotobacter vinelandii* grown in continuous culture. **J Gen Microbiol** 129: 2985-90.
- Jain S. and Ohman D.E. (2005). Role of an alginate lyase for alginate transport in mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. **Infect Immun** 73 (10): 6429-6436.

- Jarman T. and Page G. (1984). Energy requirements of microbial polysaccharides synthesis. *Arch Microbiol* 137: 231:235.
- Jenal U. and Malone J. (2006). Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria. *Annu Rev Genet* 40: 385-407.
- Kaplan A. (1969). Urea nitrogen and urinary ammonia. **Standard Methods in Clinic Chemistry**: 5: 245-256.
- Karr DB, Waters JW. and Emerich DW. (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.
- Kennedy L., Kenneth McD. and Sutherland I-W. (1992). Alginases from *Azotobacter* species. **J Gen Microbiol** 138: 2465-2471.
- Lee K.Y. and Mooney DJ. (2012). Alginate: Properties and biomedical applications. **Progr Polym Sci** 37: 106-126.
- Leitão JH. and Sá-Correia I. (1997). Oxygen-dependent upregulation of transcription of alginate genes *algA*, *algC* and *algD* in *Pseudomonas aeruginosa*. **Res Microbiol** 148: 37-43.
- Livak KJ. and Schmittgen TD. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. **Methods** 25: 402-408.
- Lozano E., Galindo E. and Peña C. (2011). Oxygen transfer rate during the production of alginate by *Azotobacter vinelandii* under oxygen limited and non oxygen-limited conditions. **Microb Cell Fact** 10:13.
- Lowry O. H., Rosenbrough N.J., Lewis A., Farr S. and Randall RJ. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. **J Biological Chem** 1:193:265-75.
- Manzo J., Cocotl-Yañez M., Tzontecomani T., Martínez V.M., Bustillos R., Velásquez C., Goiz Y., Solís, Y., López L., Fuentes L.E., Nuñez C., Segura D., Espin G. and Castañeda M. (2011). Post-transcriptional regulation of the alginate biosynthetic gene *algD* by the Gac/Rsm system in *Azotobacter vinelandii*. **J Mol Microbiol Biotechnol** 21: 147-59.
- Martinez-Salazar JM., Moreno S., Nájera R., Boucher JC., Espin G., Soberón-Chavez G. and Deretic V. (1996). Characterization of the genes coding for the putative sigma factor AlgU and its regulators MucA, MucB, MucC, and MucD in *Azotobacter vinelandii* and evaluation of their roles in alginate biosynthesis. **J Bacteriol** 178:1800-1808.
- Mejía-Ruiz, H., Guzmán J., Moreno S., Soberón-Chavez G. and Espín, G. (1997). The *Azotobacter vinelandii* *alg8* and *alg44* are essential for alginate synthesis and can be transcribed from *algD*-independent promoter. **Gene** 271-277.

- Merigui M., Lee V.T., Hyodo M., Hayakawa, Y. and Lory S. (2007). The second messenger bis-(3-5)-cyclic-GMP and its PilZ domain-containing receptor Alg44 are required for alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **65**(4), 876–895.
- Miller G. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal Chem* **31**: 426-428.
- Muhammadi and Ahmed, N. (2007). Genetics of bacterial alginate: Alginate genes distribution, organization and biosynthesis in bacteria. *Curr Genomics* **8**: 191-202.
- Oelze J. (2000). Respiratory protection of nitrogenase in *Azotobacter* species: is a widely held hypothesis unequivocally supported by experimental evidence? *FEMS Microbiol Rev.* **24**: 321-333.
- Oglesby L. L., Jain S. and Ohman E. (2008). Membrane topology and roles of *Pseudomonas aeruginosa* Alg8 and Alg44 in alginate polymerization. *Microbiology* **154**:1605-1615.
- Paletta J.L., and Ohman, D.E. (2012). Evidence for two promoters internal to the alginate biosynthesis operon in *Pseudomonas aeruginosa*. *Current microbiology* **65**: 770-775.
- Parente E., Crudele MA., Aquino M. and Clementi F. (1998). Alginate production by *Azotobacter vinelandii* DSM576 in batch fermentation. *J Ind Microbiol Biotechnol* **20**:171-176.
- Parente E., Crudele MA., Ricciardi A., Mancini M. and Clementi F. (2000). Effect of ammonium sulphate concentration and agitation speed on the kinetics of alginate production by *Azotobacter vinelandii* DSM576 in batch fermentation. *J Ind Microbiol Biotechnol* **125**:242-248.
- Pasavento C., and Hengge, R. (2009). Bacterial nucleotide-based second messengers. *Curr Opinion Microbiol* **12**:170-176.
- Peña C., Trujillo-Roldán M.A. and 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., Castillo, T., Núñez C. and Segura D. (2011). Bioprocess Design: Fermentation strategies for improving the production of alginate and Poly- β -hydroxyalkanoates (PHAs) by *Azotobacter vinelandii*. Progress in Molecular and Environmental Bioengineering -From Analysis and Modeling to Technology Applications. Angelo Carpi (ed). ISBN: 978-953-307-268-5, InTech.
- Post E., Kleiner D. and Oelze J. (1983). Whole cell respiration and nitrogenase activities in *Azotobacter vinelandii* growing in oxygen controlled continuous culture. *Archives of Microbiol* **134**:68-72.
- Price N. J., Reiterb W-D. and Raikhela N. V. (2002). Molecular Genetics of Non-processive Glycosyltransferases. In: The Arabidopsis Book. American Society of Plant Biologists. doi: 10.1199/tab.0025.
- Priego-Jiménez R., Peña C., Ramírez O. and Galindo E. (2005) Specific growth rate determines the molecular mass of the alginate produced by *Azotobacter vinelandii*. *Biochem Engin J* **25**: 187-193.

- Rediers H., Vanderleyden, J. and De Mot, R. (2004). *Azotobacter vinelandii*: a *Pseudomonas* in disguise? *Microbiol.-UK* 150, 1117–1119.
- Rehm B. and Valla S. (1997). Bacterial alginates: biosynthesis and applications. **Appl Microbiol Biotechnol** 48: 281-288.
- Rehm B.H.A. (2009). Alginate Production: Precursor Biosynthesis, Polymerization and Secretion. In *Alginates: Biology and Applications*. Rehm, B.H.A. (ed.). Berlin, Heidelberg, Germany: Springer Berlin Heidelberg, pp. 55–71.
- Remminghorst U. and Rehm B.H.A. (2006a). Bacterial alginates: from biosynthesis to applications. **Biotechnol Lett** 28: 1701–1712.
- Remminghorst U. and Rehm, B.H.A. (2006b). *In vitro* alginate polymerization and the functional role of *alg8* in alginate production by *Pseudomonas aeruginosa*. **Appl Environ Microbiol** 72: 298-305.
- Remminghorst U. and Rehm B.H.A. (2006c). Alg44, a unique protein required for alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. **FEBS Lett** 580: 3883-3888.
- Remminghorst U., Hay I.D. and Rehm, B.H.A. (2009). Molecular characterization of Alg8, a putative glycosyltransferase involved in alginate polymerization. **J Biotechnol** 140: 176-183.
- Robles-Price A., Wong T. Y., Sletta H., Valla S. and Scheiller N. L. (2004). AlgX is a periplasmic protein required for alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. **J Bacteriol** 186(21): 7369-7377.
- Romero Y., Moreno S., Guzmán J., Espin G. and Segura D. (2013). Sigma factor RpoS controls alkylresorcinol synthesis through Arp, a lys-type regulatory protein, during encystment of *Azotobacter vinelandii*. **J Bacteriol** 52: 773-780.
- Sabra W., Zeng A-P., Sabry S., Omar S. and Deckwer W-D. (1999). Effect of phosphate and oxygen concentration on alginate production and stoichiometry of metabolism of *Azotobacter vinelandii* under microaerobic conditions. **Appl Microbiol Biotechnol** 52: 773-80.
- Sabra W., Zeng A-P., Lünsdorf, H. and Deckwer, W-D. (2000). Effect of oxygen on formation and structure of *Azotobacter vinelandii* alginate and its role in protecting nitrogenase. **App Microbiol Biotechnol** 66(9): 4037–4044.
- Sabra W. and Zeng, A.P. (2009). Microbial production of alginates: Physiology and process aspects. In: **Alginates: Biology and Applications**. Rehm, B.H.A. (ed.). Berlin, Heidelberg, Germany: Springer Berlin Heidelberg, pp. 1–53.
- Sadoff H.L. (1975). Encystment and germination in *Azotobacter vinelandii*. **Bacteriol. Rev** 39 (4): 516-539.
- Seañez G., Peña C. and Galindo E. (2001). High CO₂ affects alginate production and prevents polymer degradation in cultures of *Azotobacter vinelandii*. **Enzyme Microb Technol** 29: 535–540.
- Senior P.J. and Dawes E.A. (1973). The regulation of poly- β -hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. **Biochem J** 134:225-238.

- Setubal J.C., dos Santos P., Goldman B. S., Ertesvåg H., Espin G., Rubio L.M., Valla S., Almeida N. F., Balasubramanian D., Cromes L., Curatti L., Du Z., Godsy E., Goodner B., Hellner-Burris K., Hernandez J A., Houmiel K., Imperial J., Kennedy C., Larson T. J., Latreille P., Ligon L. S., Lu J., Mærk M, Miller N. M., Norton S., O'Carroll I. P., Paulsen I., Raulfs E., Roemer R., Rosser J., Segura D., Slater S., Stricklin S L., Studholme D. J., Sun J., Viana C J., Wallin E., Wang B., Wheeler C., Zhu H., Dean D.R., Dixon R. and Wood D. (2009). Genome sequence of *Azotobacter vinelandii*, an obligate aerobe specialized to support diverse anaerobic metabolic processes. **J Bacteriol** 191 (14):4534–4545.
- Skjak-Braek G., Grasdalen H. and Larsen B. (1986) Monomer sequence and acetylation pattern y some bacterial alginates. **Carbohyd Res** 154: 239-250.
- Sun J. and Tan H. (2013): Alginate-based biomaterials for regenerative medicine applications. **Materials** 6: 1285-1309.
- Svanem B. I. G., Strand W. I., Ertesvag H., Skjak-Braek G., Hartmann M., Barbeyron T. and Valla S. (2001). The catalytic activities of the bifunctional *Azotobacter vinelandii* mannuran C-5-epimerase and alginate lyase AlgE7 probably originate from the same active site in the enzyme. **J Biol Chem** 276(34):31542-31550.
- Trujillo-Roldán M. A., Peña C. and Galindo E. (2003). Components in the inoculum determine the kinetics of *Azotobacter vinelandii* cultures and the molecular weight of its alginate. **Biotechnol Lett** 25: 1251-1254.
- Trujillo-Roldán M.A., Moreno S., Espín G. and 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.
- Yamasaki M., Ogura K., Hashimoto W., Mikami B. and Murata K. (2005). A structural basis for depolymerization of alginate by polysaccharide lyase family-7. **J Mol Biol** 352: 11–21.
- Whitney J.C., Hay I.D., Li C., Eckford P.D., Robinson H. and Amaya M.F., (2011). Structural basis for alginate secretion across the bacterial outer membrane. **Proc Natl Acad Sci USA** 108: 13083–13088.
- Weiner R.M., Hutcheson S.W., Abdel-Wahab A., Howard M., Taylor, L. E. and Ekborg N. A. (2008). Alginases systems containing alginases and methods of cloning, purifying and/or utilizing alginases. Patente estadounidense No. 7,439,034B2. Octubre 21, 2008.
- Wong T.Y., Preston L.A., and Schiller N.L. (2000). Alginate lyase: A review of major sources and enzyme characteristics, structure-function analysis, biological roles, and applications. **Ann. Rev. Microbiol.** 54:289-340.

Consultas por internet

http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3 www_slow.cgi.

ANEXO 1

Artículo publicado

Flores, C., Moreno, S., Espín, G., Peña, C. and Galindo, E. Expression of alginases and alginate polymerases in response to oxygen, and their relationship with the alginate molecular weight in *Azotobacter vinelandii*. **Enzyme and Microbial Technology**. **2013, 53: 85-91.**



Expression of alginases and alginate polymerase genes in response to oxygen, and their relationship with the alginate molecular weight in *Azotobacter vinelandii*

Celia Flores^a, Soledad Moreno^b, Guadalupe Espín^b, Carlos Peña^a, Enrique Galindo^{a,*}

^a Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, 62210, Morelos, Mexico

^b Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, 62210, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 March 2013
Received in revised form 26 April 2013
Accepted 29 April 2013

Keywords:

Dissolved oxygen
Alginate polymerization
Transcription
Alginase activity
Azotobacter vinelandii

ABSTRACT

The transcription of genes involved in alginate polymerization and depolymerization, as well as the alginase activity (extracellular and intracellular) under oxygen-limited and non oxygen-limited conditions in cultures of *A. vinelandii*, was studied. Two levels of dissolved oxygen tension (DOT) (1% and 5%, oxygen-limited and non-oxygen-limited, respectively) strictly controlled by gas blending, were evaluated in a wild type strain. In cultures at low DOT (1%), in which a high molecular weight alginate (1200 kDa) was synthesized, the transcription levels of *alg8* and *alg44* (genes encoding alginate polymerase complex), and *algX* (encoding a protein involved in polymer transport through periplasmic space) were considerably higher as compared to cultures conducted at 5% DOT, under which an alginate with a low MW (42 kDa) was produced. In the case of genes encoding for intracellular and extracellular alginases, the levels of these transcripts were higher at 1% DOT. However, intracellular and extracellular alginase activity were lower (0.017 and 0.01 U/mg protein, respectively) in cultures at 1% DOT, as compared with the activities measured at 5% DOT (0.027 and 0.052 U/mg protein for intracellular and extracellular maximum activity, respectively). The low alginase activity measured in cultures at 1% DOT and the high level of transcription of genes constituting alginate polymerase complex might be mechanisms by which oxygen regulates the production of alginates with a high MW.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Azotobacter vinelandii produces two polymers of industrial importance: the extracellular polysaccharide alginate, and the intracellular polyester, polyhydroxybutyrate (PHB). Alginates are linear exopolysaccharides composed of variable amounts of β-D-mannuronic acid and its C5 epimer α-L-guluronic acid [1,2]. Alginates are produced by algae and by bacteria belonging to the *Pseudomonas* and *Azotobacter* genera. These biopolymers have been used as thickeners, stabilizers, emulsifiers and gel or film-forming agents in several industrial applications [2,3]. Nowadays, alginates are the biomaterials most used for cell immobilization [4], and for the healing of wounds, drug delivery and tissue engineering [5]. The molecular weight of alginates (MW) is a very important

characteristic, because this determines the rheological properties of the polymer and its applications.

Polymerization is the less understood process in alginate biosynthesis [1,2]. An understanding of its participation in determining the alginate molecular weight is essential and will enable to obtain tailor-made alginates for specific applications. In the alginate production process by *A. vinelandii*, the polymer molecular weight typically increases during the first stage of cultivation (polymerization stage, due to the alginate polymerase complex activity); in a second stage, the molecular weight decreases (depolymerization stage, due to the alginase activity).

Several studies have reported the influence of dissolved oxygen tension (DOT) on alginate molecular weight produced by *Azotobacter* sp. [6–11]. However, the expression of all genes known involved in the polymerization and depolymerization stages as a function of DOT have not been studied. As a first approach, our research group determined the participation of *algL* gene (encoding for an intracellular alginase [11]) using *algL* mutant, and the extracellular alginase activity [9,11]. However, in order to understand the polymerization process in an integral way, the genes constituting the alginate polymerase complex (*alg8* and *alg44* [12–16]) and all

* Corresponding author. Tel.: +52 777 3291617; fax: +52 777 3138811.
E-mail addresses: celia@ibt.unam.mx (C. Flores), soledad@ibt.unam.mx (S. Moreno), espin@ibt.unam.mx (G. Espín), carlosf@ibt.unam.mx (C. Peña), galindo@ibt.unam.mx (E. Galindo).

genes encoding alginases reported (*algL*, *alyA1*, *alyA2*, *alyA3* and *algE7* [17,18]), should be studied. Likewise, due to the presence of at least three intracellular alginases in *A. vinelandii* genome [17], the evaluation of intracellular alginase activity in the determining the alginate molecular weight, is essential.

Some studies about alginate polymerization have been developed in *P. aeruginosa* and it has been proposed that in *A. vinelandii* the polymerization mechanism is similar [3]. It has been reported that Alg8 has structural similarity with glycosyltransferases [13,15] and is essential for alginate polymerization by *P. aeruginosa* [14]. In addition, increasing copy numbers of the *alg8* gene, increased alginate production [14]. Alg44 is key in the alginate biosynthesis in *P. aeruginosa* [16]. This protein contains a PilZ domain sensing/binding cdi-GMP, which is essential for alginate biosynthesis [19] and it has been shown to play an important role as copolymerase, highlighting the function as a subunit scaffold and/or link between Alg8 in the cytoplasmic membrane and AlgE (AlgI in *A. vinelandii*) in the outer membrane of *P. aeruginosa* [13]. Alg44 has similarity with MexA, a protein involved in the multi-drug efflux system of *P. aeruginosa* [20].

The alginate depolymerization process in *A. vinelandii* seems to be very complex. This bacterium possesses two extracellular alginases (AlgE7 and AlyA3) and three intracellular alginases (AlgL, AlyA1 and AlyA2) [17,18].

To understand the influence of some culture conditions on the alginate polymerization, the level expression of *alg8* and *algL* have been analyzed. Currently, only two studies [21,22] have related the transcription of only two genes (*alg8* and *algL*), with the oxygen uptake in *A. vinelandii* cultures, grown under nitrogen-fixing conditions and without DOT control. One study, carried out by Díaz-Barrera et al. [21] showed that, at low specific oxygen uptake rate (2.2 mmol/g h), alginates with a high MW were synthesized and an increase in *alg8* gene expression was observed, together with a low expression level of *algL*. In contrast, at higher specific oxygen uptake rates (4.8 mmol/g h), a low MW alginate was synthesized and the *algL* expression level increased, while the level of expression of *alg8*, decreased. In the same line, but varying inlet sucrose concentration and agitation rate in continuous culture of *A. vinelandii*, the relationship between the biosynthesis of alginate having a high molecular weight and the increase in the *alg8* gene expression was reported [22]. However, in contrast to the data previously reported by Díaz-Barrera et al. [21], the *algL* gene expression was not associated to a decrease in alginate molecular weight [22]. It should be pointed out that in these studies [21,22], DOT was not controlled. The control of this parameter is critical considering that DOT regulates the transcription of key genes (*algA*, *algC* and *algD*) in alginate biosynthesis and the activity of their corresponding proteins in *P. aeruginosa* [23] and in *A. vinelandii* cultures [24]. On the other hand, *alg8* and *algL* are not the only genes involved in polymerization and degradation of alginate, respectively. Therefore, a formal study, developed under strict control of the DOT was required in order to find out the role of DOT on the transcription of all genes encoding for proteins participants in polymerization and depolymerization of the alginate.

In the case of alginase activity, only the influence of extracellular activity in the drop of the alginate molecular weight produced by *A. vinelandii* has been reported [9,11]. In cultures developed at 3% DOT, a decrease of the molecular weight of the polymer (from 350 kDa to 47 kDa) and an increase of the specific extracellular alginase activity (from 0.013 U/mg_{protein} to 0.020 U/mg_{protein}), has been observed [9]. Trujillo-Roldán et al. [11] found that extracellular alginase activity of *A. vinelandii* cultures was related to the DOT level and to the culture phase. Nevertheless, the participation of intracellular alginase activity on the decrease of alginate molecular weight had not been studied, so far.

The objective of this study was to analyze the influence of DOT on the transcription of genes encoding the alginate polymerase complex (*alg8* and *alg44*); *algX*, whose protein product is involved in alginate transport through periplasmic space; as well as on *algL*, *alyA1*, *alyA2*, *alyA3*, and *algE7* genes, encoding alginases. This study also analyzed the influence of DOT on the extracellular and intracellular alginase activity. Considering that in *A. vinelandii* the synthesis of polyhydroxybutyrate (PHB) is also influenced by oxygen [3], the PHB production was also analyzed.

2. Materials and methods

2.1. Strain and culture medium

A. vinelandii ATCC 9046 was maintained by monthly subculture on Burk's agar medium (without nitrogen source) in Petri dish and was stored at 4 °C. Culture medium used in the development of bioreactor cultures, was modified Burk's medium with the following composition (in g/L): sucrose 20; ammonium acetate 1.0; K₂HPO₄ 0.66; KH₂PO₄ 0.16; CaSO₄·2H₂O 0.05; NaCl 0.2; MgSO₄ 0.2; Na₂MoO₄·2H₂O 0.0029; FeSO₄·7H₂O 0.027. pH was adjusted at 7.2 with NaOH 2 N.

2.2. Bioreactor cultures

For preparation of pre-inoculum, the surface of a Petri dish containing Burk's medium (without nitrogen source) and containing agar (18 g/L) was inoculated with *A. vinelandii* cells and incubated at 29 °C during 48 h. Later, cells from pre-inoculum were grown in 500 mL Erlenmeyer flasks containing 100 mL of modified Burk's medium and incubated at 200 rpm, 29 °C until to obtain an absorbance of 0.16 ± 0.02, (OD 540_{nm}, with a 1:50 dilution). 200 mL of this culture broth were centrifuged (1557 × g, 10 min) and the cells were re-suspended in 200 mL of fresh Burk's medium and inoculated into the bioreactor containing 1800 mL of culture medium (relation 10%, v/v). Batch cultures were carried out in a 3.0 L Applikon fermentor (Schiedam, The Netherlands) using 2.0 L of working volume. Rushton turbines with an impeller-vessel diameter ratio (D/T) of 0.36 were used. Cultures were kept at 29 °C, 500 rpm and an airflow rate of 0.5 L/min. The pH was measured with an Applikon (Netherlands) probe and controlled by an on/off system using a peristaltic pump and NaOH 2 N. Dissolved oxygen tension (DOT) was measured with an Applikon polarographic probe and controlled at 1% and 5% of the air saturation. The DOT control system was performed as previously reported by Lozano et al. [25]. Cultivations were done by triplicates of independent runs and the figures show the mean values and the standard deviations among replicas.

2.3. Analytical methods

2.3.1. Biomass, protein content, PHB concentration, sucrose consumption and mean molecular weight of the alginate

Biomass and alginate were determined gravimetrically as previously described [9]. In addition, considering that *A. vinelandii* is a bacterium producing PHB, the cell growth is presented as residual biomass (biomass measured as dry weight subtracting the PHB mass) and as protein content. Protein concentration was determined by the Lowry method [26]. Polyhydroxybutyrate analysis was performed according to Karr et al. [27], using an HPLC system (Waters, 2695) and a photodiode detector (Waters, 2996) with some modifications: a flow rate of 0.650 mL/min, 50 °C and the detection was performed at 220 nm. Polyhydroxybutyric acid (Sigma, Aldrich) was used as standard. Sucrose consumption was assayed for reducing sugars (after hydrolysis) using the dinitrosalicylic acid reagent [28]. Samples from the cultivation were treated with a β-fructofuranosidase (SIGMA) solution (2.5 mg/mL in citrates buffer pH 4.6) in order to generate glucose and fructose. 100 μL of enzyme solution was added to 0.9 mL of culture broth and the reaction was conducted during 10 minutes. Mean molecular weight of the alginate was estimated as reported by Peña et al. [9], injecting a sample of 100 μL to the HPLC.

2.3.2. Intracellular and extracellular alginase activity

For extracellular alginase activity, 10 mL of the culture broth was centrifuged (2880 × g, 20 min, 5 °C) and the sample was treated as previously described Trujillo-Roldán et al. [29]. The alginase activity was measured by a spectrophotometric assay described before [29,30] and with slight modifications. One milliliter of reaction mixture containing 0.5 mL of alginate reference solution (2.0 mg/mL) of low viscosity commercial alginate, (Sigma, Aldrich) in 50 mM Tris-HCl buffer pH 7.2, and 0.5 mL of crude extract obtained as described above, were mixed. The increase in the absorbance at 235 nm was monitored during 20 min, at 29 °C. Specific activity was expressed as the change in absorbance per minute per milligram of protein. For intracellular alginase activity, the cell pellet recovered from 5 mL of culture broth (by centrifugation at 2880 × g, 20 min, 5 °C) was used for periplasm extraction according to Franklin and Ohman [31]. Later, alginase activity was measured as previously described.

Table 1
Primers used for the quantitative RT-PCR.

Gene	Forward primers (5' to 3')	Reverse primers (5' to 3')
<i>gyrA</i>	CCAGCAAGGGCAAGTCTA	TCGTCCAGCGGCAACAGGT
<i>alg8</i>	GATCATCGGCTCCATCAAAT	GTCCGAAAGAGACAACAGC
<i>alg44</i>	AGATGAAGGGCACCTCGAC	AGCAGCTCGAAGATCACCTG
<i>algX</i>	TTTCGAGCAACTCGGCTACT	TAGGAGGTCAGTGGTGGTC
<i>algL</i>	CTGCTCACCACCGAGTACAA	GCGAACTGGAGAATTTTCAGG
<i>alyA1</i>	TATTTACCACGCTCCGAAC	GCACCTAAACGGTGGATCTT
<i>alyA2</i>	GTCCAATCATCTCCCTTCA	GTTCCTTTGCCGTTTCAGCTTC
<i>alyA3</i>	GCCTCCTCAACTTCTGCAAC	TACCTTGTCTATCCCCACCAT
<i>algE7</i>	ATCGACGGTAACCAGGACAA	TCGACCGTGACGTTGTAGTC

2.3.3. Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

For RNA extraction, cells were collected at exponential or stationary phase of growth by centrifugation (2880 × g, 20 min at 4 °C) and stored at –20 °C. qRT-PCR was carried out as previously reported by Noguez et al. [32]. Briefly, total RNA extraction was performed according to Barry et al. [33]. Genomic DNA in the samples was eliminated with DNase I (Fermentas). RNA concentration was measured by 260 nm ratio absorbance. cDNA was synthesized using 1 µg RNA, RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis kit (Fermentas) and a mixture of the specific DNA primers. The sequences of the primers used are listed in Table 1. The cDNA (5 ng) was used as template for Real-Time PCR assays. The qRT-PCR analysis was done using the Maxima TM SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2×) (Fermentas Inc.), in a LightCycler 480 Instrument (Roche). Amplification conditions were: 10 min at 95 °C, and two steps cycle: at 95 °C for 15 s and 60 °C for 60 s for a total of 40 cycles. The size of all amplicons was 100–101 bp. All Real-Time PCR reactions were performed in duplicate for each gene of each condition for each independent run, obtaining very similar values. The *gyrA* mRNA was used as internal control to normalize the results obtained for the *alg8*, *alg44*, *algX*, *alyA1*, *alyA2*, *alyA3* and *algE7* mRNAs among the evaluated conditions. The quantification technique used to analyze data was the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method reported by Livak and Schmittgen [34]. The data are reported as relative expression levels by comparing expression levels in cultures developed at 1% DOT, in each growth phase, to the expression levels of reference value (culture developed at 5% DOT, for each growth phase).

3. Results

3.1. DOT control at 1% and 5% DOT during *A. vinelandii* cultures

In order to study the effect of the dissolved oxygen tension (DOT) on the transcription of genes involved in alginate polymerization and depolymerization and on the production of their encoded proteins, a strict control of the DOT throughout culture time, was set up. DOT values analyzed in this study were established based on the conditions in which the alginate molecular weight is clearly different. In addition, considering that the critical oxygen concentration (defined as the dissolved oxygen concentration at which the specific growth rate is 95% of the maximum growth rate) for growth of *A. vinelandii* is 4% DOT [9], limiting (1%) and non-limiting (5%) conditions, were selected.

Fig. 1 shows the typical DOT profiles during the cultures conducted at 1% and 5%. The control system keeps DOT values very close to the set point. For culture at 1%, the average was $0.96 \pm 0.27\%$ and for culture at 5% DOT, the average was $4.87 \pm 0.55\%$.

3.2. Growth, PHB and alginate production, during the cultivation of *A. vinelandii* at 1% and 5% DOT

Fig. 2 shows cell growth profiles (quantified as residual biomass and protein content), PHB and alginate production, during the cultivation of *A. vinelandii* at 1% and 5% DOT. In the cultures developed at 1% DOT, 1.5 g/L of residual biomass was obtained after 54 h of cultivation; whereas 1.8 g/L was obtained at 5% DOT, after 32 h of culture time (Fig. 2a). As *A. vinelandii* produces PHB at low DOT, the cell growth was measured as protein. As shown in Fig. 2b and c, in the cultures developed at 1% DOT, the protein content was of 0.5 g/L and the PHB concentration was 3.5 g/L (at 54 h of cultivation). In contrast, in cultures at 5% DOT, a higher protein content was obtained (0.75 g/L) at 18 h; and a lower PHB

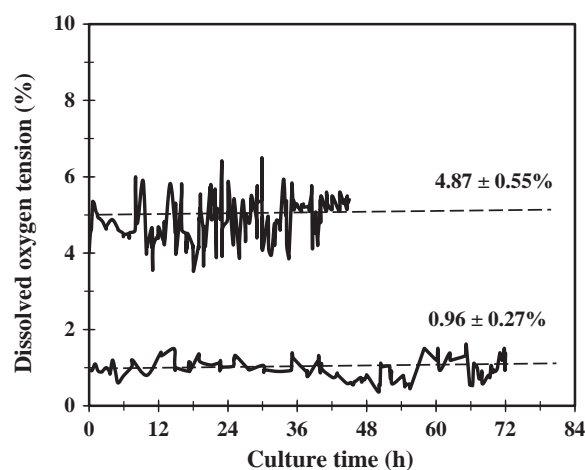


Fig. 1. Dissolved oxygen tension profiles of *Azotobacter vinelandii* cultures conducted at 1% and 5% DOT, at an airflow rate 0.5 L/min and 500 rpm stirring speed.

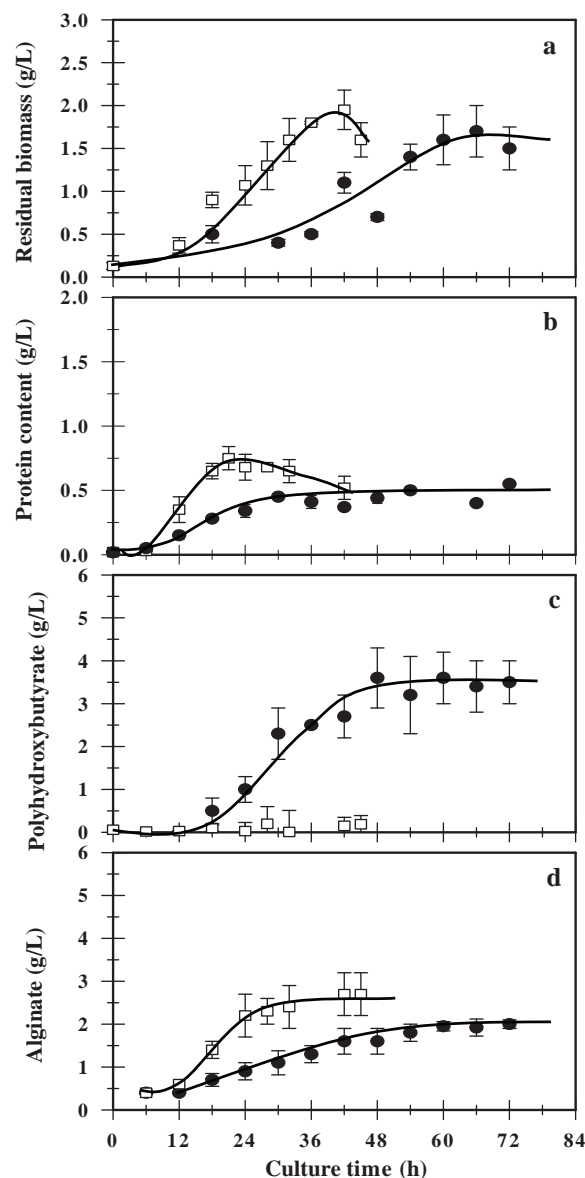


Fig. 2. Cell growth quantified as residual biomass (biomass measured as dry weight, PHB free) (a), and as intracellular protein (b); polyhydroxybutyrate production (c); alginate production (d), in *Azotobacter vinelandii* cultures developed at 1% (●) and 5% (□) DOT.

Table 2
Kinetic parameters of the cultivations as a function of the dissolved oxygen tension.

DOT (%)	μ (h^{-1})	Yield ($\text{g}_{\text{alginate}}/\text{g}_{\text{residual biomass}}$)	SAPR ($\text{g}_{\text{alginate}}/\text{g}_{\text{residual biomass}} \cdot \text{h}$)	SSUR ($\text{g}_{\text{sucrose}}/\text{g}_{\text{residual biomass}} \cdot \text{h}$)
1	0.08	1.18	0.021	0.14
5	0.17	1.5	0.049	0.23

Residual biomass: biomass PHB-free.

content was measured (0.18 g/L as maximum concentration, at 30 h of cultivation). The PHB values represented 68 and 10% (w/w) of the total dry cell weight for 1% and 5% of DOT, respectively. The specific growth rate (μ), calculated from data of protein and using the logistic model reported previously [35] was of 0.08 h^{-1} and 0.17 h^{-1} for cultures conducted at 1% and 5%, respectively (Table 2). The alginate production is shown in Fig. 2d. A higher concentration (2.4 g/L) was obtained in the cultures conducted at 5% at 30 h; whereas 1.9 g/L was obtained after 54 h of cultivation at 1% DOT.

Alginate yields (based on residual biomass) were 1.18 and $1.5 \text{ g}_{\text{alginate}}/\text{g}_{\text{residual biomass}}$, having a specific alginate production rate (SAPR) of 0.021 and $0.049 \text{ g}_{\text{alginate}}/\text{g}_{\text{residual biomass}} \cdot \text{h}$ for 1% and 5% of air saturation, respectively (Table 2). On the other hand, the specific sucrose uptake rate (SSUR) was higher at 5% DOT ($0.23 \text{ g}_{\text{sucrose}}/\text{g}_{\text{residual biomass}} \cdot \text{h}$); whereas at 1%, it was of $0.14 \text{ g}_{\text{sucrose}}/\text{g}_{\text{residual biomass}} \cdot \text{h}$ (Table 2).

3.3. Evolution of the mean molecular weight (MMW) of alginate, as a function of DOT

Fig. 3 shows the evolution of the mean molecular weight of the alginate (MMW) produced by *A. vinelandii* as a function of DOT. At 1% of air saturation, the polymer MMW was considerably higher ($1200 \pm 235 \text{ kDa}$) than that produced under 5% DOT ($42 \pm 12 \text{ kDa}$). The evolution of the alginate MMW between both conditions was different during the course of the culture. In the culture at 1% DOT, there was a period (from 18 to 36 h) where the MMW increased from 600 to 1200 kDa. Afterwards, the MMW remained constant until the end of the culture; whereas in the cultures developed at 5% DOT, after reaching the maximum molecular weight (at 18 h), a slight decrease in the polymer MMW was observed. These different profiles suggested differences both in the polymerizing activity as in the depolymerization activity in the cultures developed at 1% and 5% DOT.

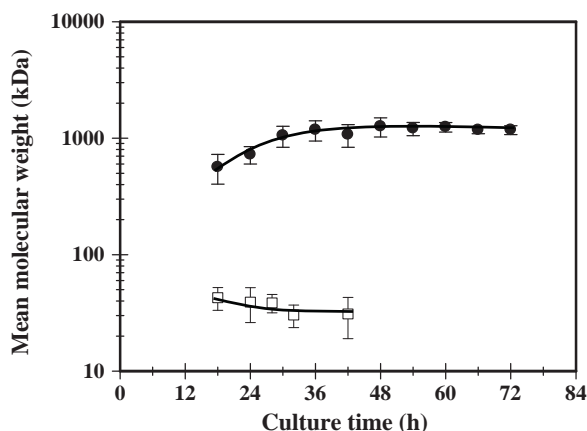


Fig. 3. Evolution of the alginate mean molecular weight in *Azotobacter vinelandii* cultures conducted at 1% (●) and 5% (□) DOT.

3.4. Influence of the dissolved oxygen on the polymerases and alginases gene transcription

Fig. 4a shows the influence of DOT on the transcription of genes involved in the polymerization (*alg8* and *alg44*), and transport (*algX*) of alginate. Transcription of these genes was analyzed both in exponential (24 h for 1% DOT and 18 h for 5% DOT) and stationary phase (48 h for 1% DOT and 32 h for 5% DOT), (Fig. 2b). The transcriptional analysis was also conducted at 12 h of cultivation (for both cultures). However, minor differences were found between both conditions (1% and 5% DOT) tested (data not shown). For this reason, only the analysis for exponential and stationary phases is reported.

The expression level of *alg8*, *alg44* and *algX* in both phases was significantly higher in cultures developed at 1% DOT (in which the MMW of alginate reached about 1200 kDa), compared to the cultures developed at 5% DOT (reference condition) in which an alginate of 42 kDa was obtained. In the exponential phase, the relative level of expression for *alg8*, *alg44* and *algX* were 6.8, 4 and 6.9, respectively. Although the expression of these genes decreased in the stationary phase with respect to the exponential phase, their level of expression (3.1, 3.8 and 3.5-fold, for *alg8*, *alg44* and *algX*, respectively) were higher than the reference culture (5% DOT).

We also determined the expression level of five alginases genes present in the *A. vinelandii* genome: *algL*, *alyA1* and *alyA2* encoding intracellular lyases, and *alyA3* and *algE7* encoding extracellular

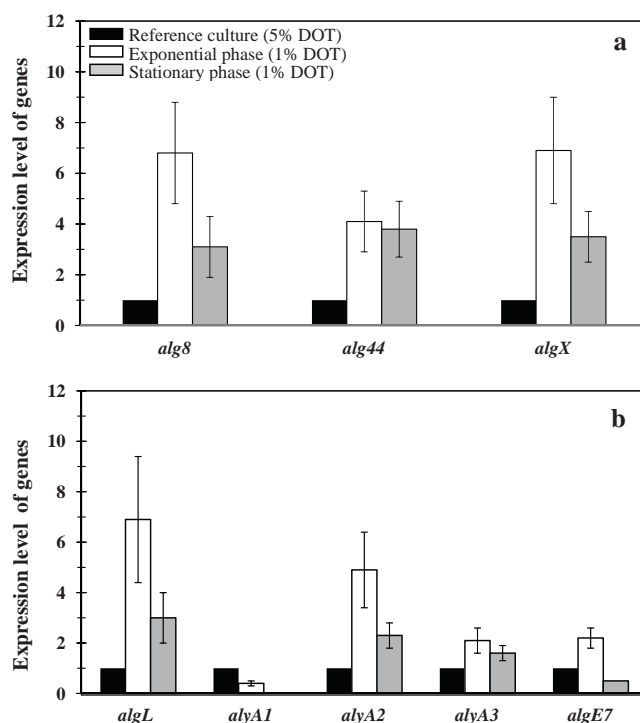


Fig. 4. Expression level of *alg8* and *alg44* (encoding alginate polymerase complex) and *algX*, a gene involved in alginate transport through the periplasmic space (a); expression level of alginate lyases genes (b), in *A. vinelandii* cultures developed at 1% and 5% of DOT. Transcription was analyzed both in exponential (24 h for 1% DOT, and 18 h for 5% DOT) and stationary phase (48 h for 1% DOT, and 32 h for 5% DOT).

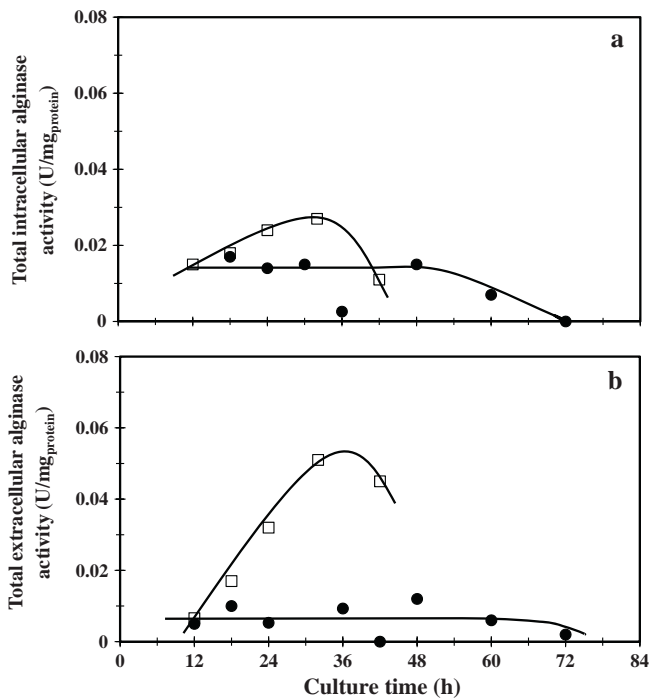


Fig. 5. Influence of the DOT on intracellular (a), and extracellular (b) alginate activity during alginate production in *A. vinelandii* cultures conducted at 1% (●) and 5% (□) DOT.

lyases (Fig. 4b). Interestingly, in the culture at 1% DOT (where alginates with a high molecular weight were obtained), the transcription of *algL* (located within the alginate biosynthetic gene cluster), showed the same expression pattern than that of the alginate polymerase complex genes, both in exponential and stationary phases. The *algL* relative expression was 6.9 and 3-fold higher than the reference culture (5% DOT) for exponential and stationary phase, respectively. The expression of *alyA1* in the exponential phase was 40% with respect to the reference culture, and in the stationary phase, this gene was not expressed. The transcription of *alyA2* in both phases was higher (4.9 and 2.3-fold for exponential and stationary phase, respectively) in cultures at 1% DOT with respect to the culture at 5%. In the case of *alyA3*, its mRNA level in cultures at 1% DOT was 2.0 and 1.6 fold higher in exponential and stationary phase, compared with the level observed in the reference cultures (conducted at 5% DOT). Finally, for *algE7* gene, its level of transcription in cultures at 1% DOT was two-fold higher in the exponential phase; whereas for the stationary phase, its expression decreased to about half the value obtained in the reference condition (5% DOT).

3.5. Intracellular and extracellular alginate activity from cultures developed at low (1%) and high (5%) DOT

The total alginate activity (both intracellular and extracellular), throughout the cultivation time, was determined and the results are shown in Fig. 5. The total intracellular alginate activity detected in the cultures conducted at 1% and 5% DOT was similar at 18 h of cultivation (Fig. 5a). Slight differences were observed from 24 to 32 h of cultivation. In cultures developed at 5% DOT, the maximum value was 0.027 U/mg_{protein} (at 32 h of cultivation). After 32 h of cultivation, the activity decreased to 0.010 U/mg_{protein}, while for cultures developed at 1% DOT, the intracellular alginate activity remained constant (around 0.015 U/mg_{protein}) from 18 to 48 h. Thereafter, and towards the end of the culture (72 h), the activity decreased to undetectable levels (Fig. 5a).

As shown in Fig. 5b, the extracellular alginate activity was 5 fold higher (0.052 U/mg_{protein}) when *A. vinelandii* was cultured at 5% DOT than that observed in the culture at 1% DOT (≤ 0.01 U/mg_{protein}). A sharp increase was observed between 12 and 32 h (corresponding to the exponential phase) (see Fig. 2b) in the cultures at 5% of DOT, reaching a maximum value at 32 h of culture. This high alginate activity was related with the low MMW of the alginate produced at 5% DOT (Fig. 3). On the contrary, during the course of cultures conducted at 1% DOT, the extracellular alginate activity was in a constant basal level (≤ 0.01 U/mg_{protein}). This was consistent with the high molecular weight of the alginate obtained (1200 kDa) under that condition.

4. Discussion

The results of the present study have shown that the DOT regulates the transcription of genes that encode proteins involved in the polymerization and degradation of alginate. Thus, this might be one mechanism by which the dissolved oxygen determines the molecular weight of alginate produced by *A. vinelandii*.

Fig. 2 and Table 2 show that, in *A. vinelandii* culture, in addition to the growth rate, the DOT is a determining factor of alginate production and sucrose uptake. These results are in line with the trend reported by other authors for the culture of *A. vinelandii* [9,10,25]. The increase in the specific sucrose uptake rate with the increase of the DOT from 1% to 5% has been also observed by Sabra et al. [7] in *A. vinelandii* grown diazotrophically in chemostat cultures and under different specific growth rates. In addition, Fig. 2c showed that under low DOT (1%), the carbon source was mainly directed to PHB production, leading to a reduced alginate production. On the contrary, when *A. vinelandii* was cultured under non-limiting conditions (5%), PHB concentration was drastically reduced and the alginate production increased. Similar effects of the oxygen concentration in the metabolism of *A. vinelandii* have been previously reported [7].

As shown in Fig. 3, the MMW of alginate was higher at lower DOT. It should be pointed out that the values of the mean molecular weight found in the present study were different to those reported by Peña et al. [9] and by Trujillo-Roldán et al. [11], for the same strain (ATCC 9046) and the same DOT evaluated. However, the culture medium and the hydrodynamic conditions occurring in the bioreactors, were different. In the present study, air flow rate, agitation rate and working volume in the bioreactor were 500 mL/min, 500 rpm and 2 L, respectively. In contrast, in the studies of Peña et al. [9] and Trujillo-Roldán et al. [11], these values were 800 mL/min, 700 rpm and 1 L, respectively. It is well known that these parameters change the oxygen transfer rate (OTR) in the cultures, and recently it was reported that the alginate production and its molecular weight are influenced by the OTR of the cultures [25].

The alginate MMW is expected to be determined by the transcription of genes and the activity of their proteins encoded involved in polymerization and degradation of this polymer. The present study reports an analysis of all the genes that have been reported to be involved in the polymerization and depolymerization of the alginate. In addition, considering that the alginate, once polymerized, should be transported through the periplasm, in order to subsequently be secreted to the extracellular environment (through the protein porin AlgJ), we analyzed the transcription of *algX*, whose product is a subunit of the alginate secretion complex (together with AlgG, AlgK and AlgL). *alg8* and *alg44* were strongly expressed at low DOT (1%) during exponential and stationary growth phases (Fig. 4a) and under this condition an alginate of high molecular weight was synthesized, confirming the participation of the products of *alg8* and *alg44* in the process of alginate

polymerization (Fig. 3). Moreover, the transcription of *algX*, increased at 1% DOT (with respect to the cultures at 5% DOT) in a similar fashion as to the levels observed for the *alg8* and *alg44* transcripts. This result supports further previous evidence in the sense that alginate polymerization and transport of the polymer through the periplasmic space to the outer membrane, is a coordinated process [36,38].

In the literature, only transcription of *alg8* in *A. vinelandii* cultures has been reported [21,22] for conditions under which DOT was not controlled. Despite of the essential role of the Alg44 protein in alginate polymerization, the effect of DOT on the expression of *alg44*, had not been determined. The PilZ sensing/binding cdi-GMP domain, present in Alg44, has been shown in *P. aeruginosa* to be essential for alginate synthesis. cdi-GMP is a central regulator of bacterial physiology and it is related to several physiological responses (such as production of exopolysaccharides and biofilm formation) in *P. aeruginosa* [19,39]. MucR, a membrane-associated protein, is also involved in alginate biosynthesis in *P. aeruginosa*, by means of the generation of a localized c-di-GMP pool in the vicinity of Alg44 [39]. MucR also contains a conserved integral membrane-sensing MHYT domain, which was proposed to sense oxygen, carbon monoxide, or nitrogen monoxide. Thus, the response of Alg44 to oxygen could be related to MucR. Taking together our results and data reported in the literature, we suggest that the high molecular weight obtained at low DOT (1%) might be due to a higher activity of the polymerases (in this case, Alg44), that results from an increase of c-di-GMP, synthesized under low DOT, by an Avin MucR homolog, in *A. vinelandii*, as it was reported for *P. aeruginosa* by Hay et al. [39].

In the present study, we showed that the expression of genes encoding alginases was a function of the DOT and the growth phase (Fig. 4b). The transcription of *algL* and *alyA2* (genes encoding intracellular alginases) was higher in cultures developed at 1% DOT in exponential and stationary growth phases. In the case of genes encoding for extracellular alginases (*alyA3* and *algE7*), at low DOT (1%), the transcription of *alyA3* increased either in exponential and stationary phases; whereas *algE7* transcription increased only in the exponential phase (Fig. 4b). These results were inconsistent with the higher mean molecular weight obtained in cultures conducted at 1% DOT. Therefore, the influence of the DOT on the activity of these proteins was analyzed. As shown in Fig. 5a and b, the intracellular and extracellular alginase activity in *A. vinelandii* cultures was affected by the DOT. Higher extracellular alginase activity was found in cultures conducted at 5% of DOT (Fig. 5b), in which a lower alginate mean molecular weight was produced (Fig. 3). On the contrary, in the cultures developed at 1% DOT, the alginase activity (both intracellular and extracellular) was lower (present in a basal level during the culture time) and the alginate mean molecular weight was higher. It is likely that intracellular alginase activity, in basal level, present in the cells cultured under 1% DOT was necessary for indispensable activities, such as the structural role proposed for AlgL in the scaffold (together with AlgG, AlgK and AlgX) for protecting the alginate during its transport through the periplasmic space [37] and/or to degrade the alginate polymers that can be accumulated in the periplasm, having a toxic effect for the cells, as it was observed for *Pseudomonas fluorescens* [38].

The physicochemical properties of the enzymes determine their activity. The activity of alginases analyzed in this study present differences in the optimum pH, in the specificity toward substrate and on their dependence on calcium. The extracellular alginase AlyA3 is the most unspecific enzyme (degrades the four possible bonds in alginate) and it has an optimum pH of 7.5 [18], (close to 7.2, value controlled during the cultures). In addition, the activity of AlyA3 and AlgE7 is favored by calcium (present in the culture medium) [18]. On the contrary, for the intracellular alginases AlgL and AlyA1, their optimum pH is close to 8 (for AlgL is between 8.1–8.4 [30];

for AlyA1 is 7.8 [18]); while AlyA2 has an optimum pH of 6.8 [18]. In addition, the activities of AlyA1 and AlyA2 are not influenced by calcium. According to these characteristics, and considering that the proteins were exposed to the similar conditions in the process (in terms of pH and calcium in the culture medium), the extracellular alginase activity was importantly promoted in cultures at 5% DOT. These results indicate that the dissolved oxygen regulates the intracellular, as well as the extracellular alginase activity. A similar phenomenon was reported by Leitão and Sá-Correia [23] for the transcription of genes involved in alginate biosynthesis (*algA*, *algC* and *algD*) and the activity of their encoded proteins in *P. aeruginosa*. These authors suggested a post-transcriptional regulation for both *algC* and *algD* genes. The discrepancy between alginases transcription and alginase activity found in the present study, can also be explained by a post-transcriptional regulation, as was recently reported for *algD* gene in *A. vinelandii* [40].

The relationship between the increase of the extracellular alginase activity and the drop of alginate molecular weight in *A. vinelandii* cultures has been previously reported [9,11]. However, this is the first time that the intracellular alginase activity is analyzed. The knowledge and comparison of the alginase activities (both intracellular and extracellular), suggests that, at low DOT, two responses are favored; on the one hand, both intracellular and extracellular alginase activity remains in a basal level, and at the other hand, the polymerase activity is likely to be higher with respect to that obtained at high DOT. This study has shown that both intracellular and extracellular alginase activity is present along the culture. Therefore, the molecular weight of the alginate can be the result of the balance between the action of the polymerase complex and the alginase activity in the culture of *A. vinelandii*.

In summary, this study has shown that the high mean molecular weight of alginate obtained at low DOT (1%) was associated to the high expression of *alg8* and *alg44*, and as a consequence, a high polymerase activity could be expected, in addition to an intracellular and extracellular alginase activity at basal level. This is a mechanism by which oxygen regulates the edition of alginate molecular weight.

Authors' contributions

CF performed the experimental work, data analysis and manuscript writing. SM was involved in the analysis of transcription of genes. GE was involved in the critical revision of the manuscript. CP and EG supervised experimental work, data analysis and they were involved in the critical revision of the manuscript.

Acknowledgements

Financial support of CONACyT (131851) and DGAPA-UNAM (IN110310) is gratefully acknowledged. We thank Santiago Becerra for oligonucleotide synthesis and Paul Gaytán for technical advice.

References

- [1] Rehm BHA, Valla S. Bacterial alginates: biosynthesis and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1997;48:281–8.
- [2] Rehm BHA. Alginate production: precursor biosynthesis, polymerization and secretion. In: Rehm BHA, editor. *Microbiology monographs. Alginates: biology and applications*. Berlin: Springer-Verlag Heidelberg; 2009. p. 55–71.
- [3] Galindo E, Peña C, Núñez C, Segura D, Espín G. Molecular and bioengineering strategies to improve alginate and polyhydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii*. *Microbial Cell Factories* 2007;6:7.
- [4] Hernández RM, Gorka O, Murua A, Pedraz JL. Microcapsules and microcarriers for *in situ* cell delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2010;62:711–30.
- [5] Lee KY, Mooney DJ. Alginate. Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science* 2012;37:106–26.
- [6] Parente E, Crudele MA, Aquino M, Clementi F. Alginate production by *Azotobacter vinelandii* DSM576 in batch fermentation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 1998;20:171–6.

- [7] Sabra W, Zeng A-P, Sabry S, Omar S, Deckwer W-D. Effect of phosphate and oxygen concentrations on alginate production and stoichiometry of metabolism of *Azotobacter vinelandii* under microaerobic conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1999;52:773–80.
- [8] Parente E, Crudele MA, Ricciardi A, Mancini M, Clementi F. Effect of ammonium sulphate concentration and agitation speed on the kinetics of alginate production by *Azotobacter vinelandii* DSM576 in batch fermentation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 2000;125:242–8.
- [9] Peña C, Trujillo-Roldán MA, Galindo E. Influence of dissolved oxygen tension and agitation speed on alginate production and its molecular weight in cultures of *Azotobacter vinelandii*. *Enzyme and Microbial Technology* 2000;27:390–8.
- [10] Sabra W, Zeng A-P, Lunsdorf H, Deckwer W-D. Effect of oxygen on formation and structure of *Azotobacter vinelandii* alginate and its role in protecting nitrogenase. *Applied and Environment Microbiology* 2000;66:4037–44.
- [11] Trujillo-Roldán MA, Moreno S, Espín G, Galindo E. The roles of oxygen and alginate-lyase in determining the molecular weight of alginate produced by *Azotobacter vinelandii*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2004;63:742–7.
- [12] Remminghorst U, Rehm BHA. Bacterial alginates: from biosynthesis to applications. *Biotechnology Letters* 2006;28:1701–12.
- [13] Oglesby LL, Jain S, Ohman DE. Membrane topology and roles of *Pseudomonas aeruginosa* Alg8 and Alg44 in alginate polymerization. *Microbiology* 2008;154:1605–15.
- [14] Remminghorst U, Rehm BHA. *In vitro* alginate polymerization and the functional role of Alg8 in alginate production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environment Microbiology* 2006;72:298–305.
- [15] Remminghorst U, Hay ID, Rehm BHA. Molecular characterization of Alg8, a putative glycosyltransferase, involved in alginate polymerisation. *Journal of Biotechnology* 2009;140:176–83.
- [16] Remminghorst U, Rehm BHA. Alg44, a unique protein required for alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Letters* 2006;580:3883–8.
- [17] Setubal JC, dos Santos P, Goldman BS, Ertesvåg H, Espín G, Rubio LM, et al. Genome sequence of *Azotobacter vinelandii*, an obligate aerobic specialized to support diverse anaerobic metabolic processes. *Journal of Bacteriology* 2009;191:4534–45.
- [18] Gimmestad M, Ertesvåg H, Heggeset TM, Aarstad O, Svanem BI, Valla S. Characterization of three new *Azotobacter vinelandii* alginate lyases, one of which is involved in cyst germination. *Journal of Bacteriology* 2009;191:4845–53.
- [19] Merighi M, Lee VT, Hyodo M, Hayakawa Y, Lory S. The second messenger bis-(3'-5')-cyclic-GMP and its PilZ domain-containing receptor Alg44 are required for alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology* 2007;65:876–95.
- [20] Akama H, Matsuura T, Kashiwagi S, Yoneyama H, Narita S-I, Tsukihara T, Nakagawa A, Nakae T. Crystal structure of the membrane fusion protein, MexA, of the multidrug transporter in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological Chemistry* 2004;279:25939–42.
- [21] Díaz-Barrera A, Aguirre A, Berrios J, Acevedo F. Continuous cultures for alginate production by *Azotobacter vinelandii* growing at different oxygen uptake rates. *Process Biochemistry* 2011;46:1879–83.
- [22] Díaz-Barrera A, Soto E, Altamirano C. Alginate production and *alg8* expression by *Azotobacter vinelandii* in continuous cultures. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 2012;39:613–21.
- [23] Leitão JH, Sá-Correia I. Oxygen-dependent upregulation of transcription of alginate genes *algA*, *algC* and *algD* in *Pseudomonas aeruginosa*. *Research in Microbiology* 1997;148:37–43.
- [24] Horan NJ, Jarman TR, Dawes EA. Studies on some enzymes of alginic acid biosynthesis in *Azotobacter vinelandii* grown in continuous culture. *Journal of General Microbiology* 1983;129:2985–90.
- [25] Lozano E, Galindo E, Peña C. Oxygen transfer rate during the production of alginate by *Azotobacter vinelandii* under oxygen-limited and non oxygen-limited conditions. *Microbial Cell Factories* 2011;10:13.
- [26] Lowry OH, Rosenbrough NJ, Lewis A, Farr S, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 1951;193:265–75.
- [27] Karr DB, Waters JW, Emerich DW. Analysis of poly-β-hydroxybutyrate in *Rhizobium japonicum* bacteroids by ion-exclusion high-pressure liquid chromatography and UV detection. *Applied and Environment Microbiology* 1983;46:1339–44.
- [28] Miller G. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 1959;31:426–8.
- [29] Trujillo-Roldán MA, Moreno S, Segura D, Galindo E, Espín G. Alginate production by an *Azotobacter vinelandii* mutant unable to produce alginate lyase. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2003;60:733–7.
- [30] Ertesvåg H, Erlien F, Skjåk-Bræk G, Rehm BHA, Valla S. Biochemical properties and substrate specificities of a recombinantly produced *Azotobacter vinelandii* alginate lyase. *Journal of Bacteriology* 1998;180:3779–84.
- [31] Franklin MJ, Ohman DE. Mutant analysis and cellular localization of the AlgI, AlgJ, and AlgF proteins required for O acetylation of alginate in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 2002;184:3000–7.
- [32] Noguez R, Segura D, Moreno S, Hernández A, Juárez K, Espín G. Enzyme I^{Ntr}, NPr and IIA^{Ntr} are involved in regulation of the poly-β-hydroxybutyrate biosynthetic genes in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 2008;15:244–54.
- [33] Barry T, Geary S, Hannify S, MacGearailt C, Shalloo M, Heery D, et al. Rapid mini-preparations of total RNA from bacteria. *Nucleic Acids Research* 1992;20:4940.
- [34] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method. *Methods* 2001;25:402–8.
- [35] Klimek J, Ollis D. Extracellular microbial polysaccharides: kinetics of *Pseudomonas sp. Azotobacter vinelandii*, and *Aureobasidium pullulans* batch fermentations. *Biotechnology and Bioengineering* 1980;22:2321–42.
- [36] Robles-Price A, Wong TY, Sletta H, Valla S, Schiller NL. AlgX is a periplasmic protein required for alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 2004;186:7369–77.
- [37] Jain S, Ohman DE. Role of an alginate lyase for alginate transport in mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity* 2005;73:6429–36.
- [38] Bakkevig K, Sletta H, Gimmestad M, Aune R, Ertesvåg H, Degnes K, et al. Role of the *Pseudomonas fluorescens* alginate lyase (AlgL) in clearing the periplasm of alginates not exported to the extracellular environment. *Journal of Bacteriology* 2005;187:8375–84.
- [39] Hay ID, Remminghorst U, Rehm BH. MucR, a novel membrane-associated regulator of alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environment Microbiology* 2009;75:1110–20.
- [40] Manzo J, Cocotl-Yañez M, Tzontecomani T, Martínez VM, Bustillos R, Velásquez C, et al. Post-transcriptional regulation of the alginate biosynthetic gene *algD* by the Gac/Rsm system in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 2011;21:147–59.

ANEXO 2

METODOS ANALITICOS

A2.1. Cuantificación de biomasa.- 10 mL del caldo de cultivo fueron centrifugados a 11 000 rpm, 10 min (centrífuga eppendorf 5804). Se separó el sobrenadante y el paquete celular se filtró al vacío a través de membranas de acetato de celulosa (Sartorius) de 0.2 μm de tamaño de poro, previamente taradas (24 h a 70°C). Las muestras fueron secadas en estufa (24 h a 70°C) (Felisa) para la obtención de un peso constante. Las muestras se mantuvieron en un desecador hasta adquirir temperatura ambiente (aprox. 1.5 h). Finalmente las muestras se pesaron y por diferencia de peso se obtuvo la cantidad de biomasa.

A2.2. Cuantificación de alginato.- El alginato se extrajo mediante su precipitación con isopropanol y posteriormente se cuantificó por gravimetría. 10 mL del caldo de cultivo fueron centrifugados a 11 000 rpm, 10 min. Al sobrenadante se adicionó 30 mL de isopropanol. La mezcla se agitó vigorosamente y se incubó a 4°C, 20 min. El alginato se separó por centrifugación a 4 000 rpm por 10 min y se filtró al vacío a través de membranas de acetato de celulosa (Sartorius) de 0.2 μm de tamaño de poro. Posteriormente se siguió el procedimiento descrito en la sección A.2.1.

A2.3. Cuantificación de proteína.-

Preparación de las muestras.- 1 mL de caldo de cultivo se centrifugó 10 000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante se desechó y al paquete celular se adicionó 1 mL de MgSO_4 10 mM. Las células se resuspendieron y nuevamente se centrifugó a las condiciones mencionadas anteriormente. Las células se resuspendieron en agua destilada. Para las primeras 30 horas de cultivo en general, se concentraron a la mitad del volumen y las muestras correspondientes a los tiempos finales de cultivo se diluyeron hasta en un factor de 4. Se consideraron los factores de dilución o de concentración, según sea el caso, en los cálculos correspondientes.

Curva patrón.- Se preparó una curva patrón con albumina bovina (US biological) a concentraciones de 0.1, 0.2, 0.4, 0.6 y 0.8 mg/mL. La curva se realizó por duplicado. La técnica de análisis se describe a continuación:

Se tomaron 200 μL de la solución estándar y se añadió 1 mL de solución reactiva. La mezcla se agitó y dejó reaccionar 10 min. Se añadió 0.1 mL de reactivo de Folin (Sigma-Aldrich) (diluido

1:1 v/v con H₂O destilada). Se agitó y se dejó reaccionar 30 min en oscuridad. Se leyó la absorbancia a 625 nm (espectrofotómetro Variant Cary 1E). La ecuación de la curva patrón fue:

$$\text{Proteína (mg/mL)} = (\text{Absorbancia}_{625} - 0.0787) / 1.6779 \quad r^2 = 0.9911$$

Las muestras problema fueron tratadas de la misma forma que los estándares. El cálculo de la concentración de proteína se realizó extrapolando los valores de las muestras en la curva patrón.

Soluciones.- La solución reactiva está constituida de tres soluciones mezcladas en relación 98:1:1, para las soluciones A, B, C, respectivamente.

Solución A: Na₂CO₃ 2 % en NaOH 0.1N.

Solución B: Tartrato de sodio y potasio 2 %.

Solución C: CuSO₄ 1 %.

A2.4. Cuantificación de sacarosa residual.- Se determinó espectrofotométricamente utilizando el método de ácido dinitrosalicílico (DNS) (Sigma-aldrich) reportado por Miller (1959). En la reacción se forma un compuesto aminado amarillo, cuya densidad óptica a 540 nm es proporcional a la concentración de los grupos reductores. Previamente se realizó la hidrólisis enzimática de la sacarosa utilizando β-fructofuranosidasa y posteriormente se realizó la medición de los azúcares reductores libres por la reducción del ácido dinitrosalicílico.

Curva patrón.- Se realizó una curva de calibración utilizando sacarosa en concentraciones de 0.1 a 1.0 g/L y se realizó el siguiente procedimiento: en tubos de vidrio se colocaron 0.9 mL de solución estándar y se adicionó 0.1 mL de solución de la enzima β-fructofuranosidasa (2.5 mg/mL en buffer de citratos pH 4.6). Se agitó e incubó a temperatura ambiente 10 min y se adicionó 1 mL de solución de DNS. Las muestras se calentaron en baño de agua en ebullición durante 5 min e inmediatamente se enfriaron en hielo. Se adicionaron 10 mL de agua destilada y se leyó la absorbancia a 540 nm. La ecuación de la curva fue:

$$\text{Sacarosa (g/L)} = (\text{Absorbancia}_{540} + 0.0003) / 0.028 \quad r^2 = 0.9955$$

Las muestras de los procesos fueron tratadas de la misma forma que los estándares, con previa dilución 1/20 utilizando agua destilada.

Soluciones: La solución de DNS se preparó disolviendo 16 g de NaOH y 300 g de tartrato de sodio y potasio en 800 mL de agua destilada. Con calentamiento suave de la solución se añadieron lentamente 16 g de DNS. Finalmente la solución se aforó a 1 L con agua destilada.

Buffer de citratos: Se disolvieron 0.197 g de ácido cítrico en 50 mL de agua destilada. De forma independiente se disolvieron 9.1 g de citrato de sodio en 50 mL de agua destilada. Posteriormente se adicionó lentamente el citrato de sodio al ácido cítrico hasta alcanzar un pH de 4.6.

A2.5. Determinación del peso molecular promedio del alginato.- El peso molecular promedio del alginato fue determinado por cromatografía de filtración en gel (GPC) usando una serie de columnas Ultrahidrogel (UG 500 y 2000, Waters) de 7.8 mm (diámetro interno) por 300 mm, acopladas a un equipo de HPLC (Waters, 2695) con un detector de índice de refracción (Waters, 2414). Se utilizó como fase móvil NaNO_3 0.1 M a 35°C con un flujo de 0.9 mL/min. La señal del detector fue procesada con un programa PC compatible (Empower, Waters). Se realizó una curva de calibración utilizando pululanos de *Aureobasidium pullulans* como estándares de peso molecular con un rango de 5,800 a 2,500, 000 Da. Para la preparación de la muestra a analizar del, 3 mg de alginato (obtenido de acuerdo al procedimiento descrito en la sección A2.2) fueron disueltos en 1 mL de agua destilada y filtrados por membranas de 0.45 μm (Filtro Titan3 17 mm pore size 0.45 μm , Thermo Scientific) para remover residuos de partículas. Se inyectaron 100 μL de muestra para el análisis.

A2.6. Cuantificación de PHB.- El PHB se determinó como ácido crotónico, el cual se produce por la hidrólisis con ácido sulfúrico concentrado. La técnica se adaptó de Karr *et al.*, (1983). La cuantificación se realizó por HPLC, con una columna Aminex HPX-87H (Biorad). Se utiliza un detector de arreglo de diodos a 220 nm. La fase móvil fue una solución de ácido sulfúrico 0.014N, a un flujo de 0.650 mL/min y a una temperatura de 50°C. Se inyectaron 20 μL de muestra. Se realizó una curva de calibración utilizando ácido polihidroxi-butírico (Sigma-Aldrich) a concentraciones de 0.01, 0.02, 0.05 y 0.1 g/L, disuelto en solución de fase móvil. Para la extracción se pesaron aproximadamente 3 mg de biomasa seca (70 °C, 24 h) y se adicionó 1 mL de ácido sulfúrico. Las muestras se calentaron a 90°C durante 1 hora (en un Themomixer R, Eppendorff) y 700 rpm. El extracto se diluyó 1:100 con agua MilliQ.

La ecuación de la curva fue:

$$\text{PHB (g/L)} = (\text{Area} - 182819)/1\text{E}+08 \quad r^2 = 0.9976$$

A.2.7. Cuantificación de amonio

Preparación de estándares: A partir de una solución de acetato de amonio a 1 g/L, se realizaron las diluciones correspondientes para preparar soluciones estándares de 0.1, 0.2, 0.4, 0.6 y 0.8 g/L. El análisis se realiza por duplicado (tanto para estándares como para las muestras del proceso).

El método utiliza las siguientes soluciones preparadas con agua bidestilada.

Solución A:	Fenol 0.106 M
	Nitroferricianuro de sodio 0.17mM
Solución B:	Hidróxido de sodio 0.125 N
	Hipoclorito de sodio 11 mM

Estándares para la curva de calibración

El procesamiento de los estándares es el siguiente:

- Se colocó 1 mL de la solución A en un tubo *Eppendorf* de 2 mL y se tapó con tapa de rosca. Tapar
- Se adicionaron 25 μL de muestra del estándar. Se agitó en un vortex (Maxi mix II, modelo M37615) durante aproximadamente 4 segundos.
- Adicionar 1 mL de la solución B. Este reactivo se adiciona de manera secuencial cada 30 segundos a cada una de las muestras. Tapar y agitar vigorosamente. A partir de que se adiciona la solución B se cuentan 30 minutos de reacción. Así, las muestras deben leerse cada 30 segundos, en el orden en que se adicionó la solución B, para que todas las muestras tengan los 30 minutos de reacción. Durante este tiempo, las muestras desarrollan el color “azul de prusia”, característico de la reacción.
- Se cuantificó absorbancia en un espectrofotómetro a 635 nm. Ajustar a cero la absorbancia previamente, utilizando un blanco constituido por 1 mL de solución A, 1 mL de solución B y 25 μL de agua desionizada.

Las lecturas de absorbancia y los valores correspondientes a cada concentración de ión amonio se ajustan a una línea recta por el método de mínimos cuadrados, determinándose los valores de la pendiente y de la ordenada al origen para caracterizar la curva de calibración.

La ecuación de la curva fue:

$$\text{Amonio (g/L)} = (\text{Absorbancia}_{635} - 0.0718) / 3.5118 \quad r^2 = 0.9945$$

El análisis de las muestras de fermentación se realizó con el mismo procedimiento descrito para los estándares.

A2.8. Actividad alginasa extracelular.- La reacción se realizó en celda de cuarzo, a 29°C y se monitoreo la absorbancia durante 20 minutos. La reacción estuvo constituida por 0.5 mL de solución de alginato comercial (2 mg/mL) de *Macrocystis pyrifera* (Sigma-Aldrich) en *buffer* Tris HCl 0.05M, pH 7.2, y 0.5 mL de caldo de sobrenadante del caldo de cultivo.

Previo a la reacción de cuantificación, a los caldos de cultivo se les eliminó el alginato. Para ello, al caldo se adicionó CaCl₂ (0.2 g por cada 10 mL de caldo) y se incubó 3 h a 4°C. El caldo se centrifugó a 11 000 rpm, 4°C, 20 minutos. Se desechó el sólido y el sobrenadante fue dializado en membranas de 14 kDa (Spectrum Laboratories. Inc.) utilizando en *buffer* Tris HCl 0.02M, pH 7.2, durante 12 h a 4°C.

En la reacción se utilizaron dos diferentes controles negativos, uno estuvo constituido por sustrato y *buffer*, y otro por sustrato y muestra que previamente fue calentada a 90 C, 15 minutos. Como control positivo se utilizó la alginasa comercial de *Flavobacterium sp.* (Sigma-Aldrich). La actividad se expresó como el incremento en la absorbancia por minuto por mg de proteína.

A2.9. Actividad alginasa intracelular.- 10 mL de caldo de cultivo fueron centrifugados a 11 000 rpm, 20 min, a 4°C. El *pellet* celular fue utilizado para la extracción periplásmica y el sobrenadante para cuantificación de la actividad alginasa extracelular. El *pellet* se resuspendió dos veces en solución salina (0.9% p/v) y se centrifugó a 5 000 rpm, 10 min, a 4°C. El *pellet* se lavó con *buffer* de extracción periplásmica (PEB, por sus siglas en inglés, y constituido por

sacarosa 20 % y TRIS 0.030 M, pH=8) y se centrifugó a 10 000 rpm, 10 min, a 4°C. Se pesaron 0.2 g del *pellet* (peso húmedo) en un tubo *Eppendorff* de 1.5 mL y se resuspendieron en 1 mL de *buffer* PEB. Se adicionaron 50 µL de solución de lisozima (10 mg lisozima (Sigma Aldrich) en 1 mL de PEB, e incubados 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionaron 20 µL de solución EDTA (EDTA 0.1 M en PEB) y se incubó 15 min a temperatura ambiente. Las muestras fueron centrifugadas a 10 000 rpm, 20 min, a 4°C. El sobrenadante que contenía la fracción periplásmica se utilizó para la cuantificación de la actividad alginasa extracelular. El *pellet* restante, que contenía los esferoplastos, se desechó.

Se cuantificó la concentración de proteína (como se describe en la sección A2.3). La actividad alginasa se determinó siguiendo el método descrito para la actividad extracelular.

A2.10. Análisis de transcripción génica mediante PCR en tiempo real

Extracción, purificación de RNA y análisis por PCR en tiempo real (RT-PCR)

Extracción del RNA.- El paquete celular fue resuspendido en 2 mL de MgSO₄ 0.01 M (para eliminar el alginato de las células) y centrifugado 8 000 rpm, 4°C, 20 min. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla celular se resuspendió en 60 µL de DEPC 0.1 % (v/v).

- Adicionar 6 µL de DEPC 0.5 % (v/v).
- Adicionar 200 µL de acetona helada (debe mantenerse en congelador). Mezclar manualmente.
- Centrifugar 10 000 rpm, 2 minutos, 5°C. Desechar el sobrenadante con cuidado (con una punta).
- Resuspender la pastilla en 60 µL de DEPC 0.1 % (con la punta, subiendo y bajando el líquido).
- Agregar 10 µL de lisozima, (10 mg/mL en DEPC 0.5 %), agitar manualmente (hacia arriba y hacia abajo el tubo, 1 min). Incubar a 37°C, 10 minutos (sin agitación).
- Adicionar 2 µL de Proteinasa K (100 µg/mL en DEPC 0.5 %). Agitar manualmente (hacia arriba y hacia abajo el tubo, 1 min). Incubar en hielo 10 minutos.
- Agregar 3.5 µL de DEPC 0.5 %, 200 µL de Fenol (precalentado a 70°C). Adicionar 150 µL de Cloroformo y mezclar manualmente (con la punta). Adicionar 150 µL de DEPC 0.1 %. Centrifugar a 12 000 rpm, 4°C, 5 minutos.
- Extraer el sobrenadante, fase superior, sin tocar la membrana (células) que se forma en la parte intermedia del tubo) y transferir a otro tubo *Eppendorf*. Repetir el paso anterior a partir de la adición de fenol.

- A la fase extraída adicionar 1 mL de etanol absoluto. Precipitar a -20°C, al menos 24 horas.
- Centrifugar a 12 000 rpm, a 10°C, 5 minutos.
- Eliminar el etanol por decantación
- Evaporar el etanol en centrífuga al vacío 10 min, 30°C.
- Colocar en hielo los tubos
- Resuspender en 50 µL de DEPC 0.1 %. Dejar hidratar al menos dos horas, si no se continúa con el proceso, almacenar el RNA a -20°C.

Cuantificación del RNA La cuantificación se realizó en Nanodrop a 240 nm. Además, se verificó la integridad del RNA mediante un gel.

Tratamiento de RNA con DNAsa. Para eliminar posible contaminación del RNA con DNA, el RNA se trató con DNAsaI (Fermentas Life Science). A 5 µg de RNA contenidos en 16 µL de DEPC 1 %. Adicionar 2 µL del *buffer* de la DNAsa y 2 µL de la enzima DNAsa. Agitar la solución suavemente (en vortex). Incubar una hora a 37°C. Inmediatamente incubar a 65°C, 10 minutos. Verificar la pureza del RNA (libre de DNA) mediante una reacción de PCR.

Síntesis de cDNA. - Para la transcripción reversa se utilizaron 200 ng de RNA de cada condición y se utilizó un kit un Kit Revert Aid™ H minus First Strand cDNA Synthesis (Fermentas Life Science), según la metodología recomendada por el proveedor.

El RNA se diluyó a 100 ng/µl en agua con DEPC. Se tomaron 2 µl de RNA (200 ng) y se agregaron 2 pmoles de cada primer (reverso), tanto de los genes cuya expresión se deseaba cuantificar, como del gen control (*gyrA*). Para el diseño se utilizó el programa disponible para tal efecto en http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www_slow.cgi. La secuencia de los primers se presenta en la tabla 5.2 del capítulo 5.

El volumen de la reacción se llevó a 12 µl con agua con DEPC 1 %. Se mezcló y centrifugó brevemente. Posteriormente se añadió:

<i>Buffer</i> de reacción 5X	4 µl
Inhibidor de nucleasas RiboLock de 20u/µl	1 µl
Mezcla de dNTPs 10 mM	2 µl

Se incubó a 37°C por 5 minutos, se adicionó 1 µl de la enzima reverso transcriptasa RevertAid™ (200 u/µl), quedando un volumen final de 20 µl. La mezcla se incubó a 42°C por 60 min. La reacción se detuvo calentando a 70°C por 10 min.

PCR de tiempo real. La PCR de tiempo real se realizó con un equipo ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Perkin-Elmer/Applied Bio-systems) usando SYBR Green PCR Master Mix (Perkin-Elmer/Applied Bio-systems). Para estas reacciones, los cDNAs resultantes de la reverso transcripción de 200 ng de RNA de cada condición se diluyeron 1:10 en agua estéril y se tomó 1 µl. Se añadieron 10 µl de la mezcla maestra SYBR Green, 7 µl de agua estéril y 2 µl de los oligos “forward” y “reverse” correspondientes al gen cuyo cDNA se deseaba cuantificar (concentración final de los oligos 250 nM). Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo de 10 min a 95°C, y 40 ciclos de dos pasos, a 95°C por 15 s y a 60°C por 60 s. El tamaño de todos los amplímeros fue de 100-101 bp. Todas las reacciones de RT PCR se realizaron por duplicado para cada gen y para cada condición de TOD. Adicionalmente, para cada gen la cuantificación se realizó utilizando dos amplificaciones independientes usando dos pares de oligos diferentes. La cantidad de mRNA del gen *gyrA* (que codifica para una subunidad de la DNA girasa) se usó como control interno para normalizar los resultados obtenidos para los mRNAs de los genes analizados en el cultivo referencia (5 % TOD) y los correspondientes a 1 % de TOD. El análisis de datos se realizó mediante el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ reportado por Livak y Shmittgen (2001).