



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

PRODUCCIÓN DE ALGINATO DE ALTO PESO MOLECULAR MEDIANTE EL EMPLEO DE LA CEPA AT9 DE *Azotobacter vinelandii* EN CULTIVOS LOTE EN BIORREACTOR DE 3 L BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE TRANSFERENCIA DE OXÍGENO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
ABRAHAM MEDINA VALDEZ

TUTOR PRINCIPAL
DR. Carlos Felipe Peña Malacara
[Instituto de Biotecnología](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dra. Elda Guadalupe Espín Ocampo
Dra. Clarita Olvera Carranza
[Instituto de Biotecnología](#)

Cuernavaca, Morelos, Noviembre, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. Carlos Felipe Peña Malacara. Durante la realización del mismo se contó con beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) 761150.

También se contó con el financiamiento del Programa CONACyT-DFG (Fundación Alemana para la Investigación Científica), a través del proyecto 277600.

AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Carlos Peña** por permitirme formar parte de su grupo de trabajo y ser la guía para la realización del mismo. Por la enseñanza, la crítica, la exigencia, los consejos y la ayuda que me brindó.

A la **Dra. Celia Flores** y **Dra. Tania Castillo** por el apoyo técnico y crítico que me brindaron para sacar adelante el proyecto.

Al **Dr. Holjes Salgado** y la **M. Johanna Torres** por su apoyo técnico y su amistad.

A los miembros del comité tutorial, **Dra. Guadalupe Espín** y **Dra. Clarita Olvera**, por la crítica y retroalimentación a mi trabajo.

DEDICATORIAS

A mis padres

Anel y Mauricio

A mis hermanas

Alondra y Kissel

A mi cuñado y sobrinos

Luis Alberto, Luis Alonso y Luis Ernesto

Por todo el amor y apoyo que siempre me han mostrado.

A los paleopapus del C-102

Arturo y Chaparro

Por su amistad y el apoyo que me han brindado en lo profesional y en lo personal.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	III
ÍNDICE DE TABLAS.....	V
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VI
RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
2. ANTECEDENTES.....	4
2.1 Alginato.....	4
2.2 Características químicas y físicas del alginato.....	5
2.3 Aplicaciones del alginato.....	7
2.4 Biosíntesis de alginato por <i>Azotobacter vinelandii</i>	9
2.5 Influencia de la disponibilidad de oxígeno sobre la producción de alginato.....	11
2.6 <i>Azotobacter vinelandii</i> AT9.....	12
2.7 Biosíntesis de PHB por <i>A. vinelandii</i>	13
3. JUSTIFICACIÓN.....	14
4. HIPÓTESIS.....	15
5. OBJETIVOS.....	16
5.1 OBJETIVO GENERAL.....	16
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	16
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	17
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
7.1 Cepas de <i>Azotobacter vinelandii</i> y preservación de cepas.....	18
7.2 Medio de cultivo.....	18
7.3 Generación del inóculo.....	19
7.4 Cultivos lote en biorreactor.....	19
7.5 Determinación de la velocidad de transferencia de oxígeno máxima.....	20
7.6 Métodos analíticos.....	20
7.6.1 Determinación de la concentración de proteína soluble.....	20
7.6.2 Determinación de biomasa por masa seca.....	22
7.6.3 Consumo de sacarosa.....	22

7.6.4 Determinación espectrofotométrica de alginato por el método de carbazol.....	24
7.6.5 Determinación del peso molecular del alginato.....	25
7.6.6 Determinación del grado de acetilación del alginato.....	26
7.6.7 Determinación de la viscosidad del caldo de cultivo.....	26
7.6.8 Determinación de la capacidad viscosificante.....	27
7.6.9 Determinación del contenido de PHB.....	27
7.7 Análisis estadístico.....	28
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
8.1 Los cultivos se desarrollaron en condiciones de limitación de oxígeno.....	29
8.2 El incremento en la $VTO_{máx}$ favoreció el crecimiento celular.....	31
8.3 Contenido de PHB no se vio afectado por la $VTO_{máx}$	36
8.4 El incremento en la $VTO_{máx}$ no afectó la producción de alginato para la cepa AT9.....	38
8.5 El alginato de mayor peso molecular se presentó en condiciones de menor $VTO_{máx}$	41
8.6 El incremento en la $VTO_{máx}$ favoreció la acetilación del alginato.....	46
8.7 Las mayores viscosidades y capacidades viscosificantes se obtuvieron en condiciones de mayor $VTO_{máx}$	48
9. CONCLUSIONES.....	57
10. PERSPECTIVAS.....	58
11. REFERENCIAS.....	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Estructura química del alginato. <i>a)</i> Monómeros de ácido β -D-manuronato y α -L-guluronato, <i>b)</i> conformación de la cadena (los cuadros rojos indican los enlaces β -(1 \rightarrow 4) y <i>c)</i> conformación en bloques. Modificado de Nalamothu <i>et al.</i> (2014).....	4
Figura 2.2. Modelo caja de huevo. Interacción iónica entre residuos G del alginato e iones divalentes (círculos naranjas). Tomado de Sun and Tan (2013).....	5
Figura 2.3. Efecto de la concentración y el peso molecular del alginato sobre la viscosidad. Tomado de Gómez-Pazarín <i>et al.</i> (2015) y Vicini <i>et al.</i> (2018).....	7
Figura 2.4. Representación esquemática de la biosíntesis de alginato por <i>Azotobacter vinelandii</i> . Modificado de Urtuvia <i>et al.</i> (2017).....	9
Figura 6.1. Estrategia experimental seguida durante el desarrollo del presente trabajo.....	17
Figura 8.1. Velocidad de transferencia de oxígeno máxima para los cultivos desarrollados bajo diferentes condiciones de agitación para la cepa AT9 (<i>a</i>) y la cepa ATCC90 (<i>b</i>) de <i>A. vinelandii</i> . Tensión de oxígeno disuelto para los cultivos con la cepa AT9 (<i>c</i>) y ATCC9046 (<i>d</i>) bajo diferentes condiciones de transferencia de oxígeno máxima.....	31
Figura 8.2. Crecimiento celular medido como <i>a</i> y <i>b</i>) biomasa, <i>c</i> y <i>d</i>) proteína y <i>e</i> y <i>f</i>) consumo de sacarosa de cultivos de <i>A. vinelandii</i> desarrollados a diferentes velocidades de transferencia de oxígeno máxima. <i>a</i> , <i>c</i> y <i>e</i> corresponden a la cepa AT9. <i>b</i> , <i>d</i> y <i>f</i> corresponden a la cepa ATCC9046.....	33
Figura 8.3. Contenido de PHB en cultivos de <i>A. vinelandii</i> AT9 (<i>a</i>) y ATCC9046 (<i>b</i>) desarrollados a diferentes velocidades de transferencia de oxígeno máxima.....	37
Figura 8.4. Perfiles de producción de alginato en cultivos de las cepas AT9 (<i>a</i>) y ATCC9046 (<i>b</i>) de <i>Azotobacter vinelandii</i> desarrollados a diferentes velocidades de transferencia de oxígeno máxima.....	38
Figura 8.5. Efecto de la velocidad de transferencia de oxígeno máxima sobre la producción máxima de alginato en cultivos con la cepa AT9 (barras azules) y la cepa ATCC9046 (barras rojas) de <i>A. vinelandii</i>	40
Figura 8.6. Peso molecular promedio del alginato producido en cultivos de <i>A. vinelandii</i> AT9 (<i>a</i>) y ATCC9046 (<i>b</i>) desarrollados a diferentes velocidades de transferencia de oxígeno máxima.....	42
Figura 8.7. Efecto de la velocidad de transferencia de oxígeno máxima sobre el peso molecular promedio máximo de alginato en cultivos con la cepa AT9 (barras azules) y la cepa ATCC9046 (barras rojas) de <i>A. vinelandii</i>	43

Figura 8.8. Índice de polidispersión del alginato producido en cultivos de <i>A. vinelandii</i> AT9 (a) y ATCC9046 (b) desarrollados a diferentes velocidades de transferencia de oxígeno máxima....	45
Figura 8.9. Grado de acetilación del alginato producido en cultivos de <i>A. vinelandii</i> AT9 (a) y ATCC9046 (b) desarrollados a diferentes velocidades de transferencia de oxígeno máxima.....	46
Figura 8.10. Viscosidad del caldo de cultivos de las cepas AT9 (a) y ATCC9046 (b) de <i>A. vinelandii</i> desarrollados a diferentes velocidades de transferencia de oxígeno máxima	48
Figura 8.11. Relación viscosidad vs concentración del alginato del caldo de cultivos de <i>A. vinelandii</i> AT9 (a) y ATCC9046 (b) desarrollados a diferentes velocidades de transferencia de oxígeno máxima.....	49
Figura 8.12. Comparación entre el peso molecular del alginato (a y b) y la viscosidad del caldo de cultivo (c y d) a través del tiempo de cultivo.....	51
Figura 8.13. Comparación entre el grado de acetilación del alginato (a y b) y la viscosidad del caldo de cultivo (c y d) a través del tiempo de cultivo.....	53
Figura 8.14. Cambio del pH del caldo de cultivos de <i>A. vinelandii</i> AT9 (a) y ATCC9046 (b) desarrollados a diferentes velocidades de transferencia de oxígeno máxima.....	54
Figura 8.14. Relación entre el pH y la viscosidad del medio de cultivo para la cepa AT9 (a) y ATCC9046 (b) de <i>A. vinelandii</i>	54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. Aplicaciones del alginato en los diferentes sectores industriales. (Adaptado de Draget <i>et al.</i> , 2005; Lee and Mooney, 2012).....	8
Tabla 2.2. Aplicación del alginato en función de su peso molecular. (Adaptado de Pacheco-Leyva <i>et al.</i> , 2016).....	8
Tabla 7.1. Composición del medio Burk-sacarosa y extracto de levadura.....	19
Tabla 8.1. Valores de producción máxima de biomasa, velocidad específica de crecimiento y rendimientos en la producción de biomasa con base al consumo de sacarosa para cada cepa bajo diferentes transferencias de oxígeno.....	34
Tabla 8.2. Valores de producción máxima de proteína, velocidad específica de crecimiento y rendimientos en la producción de proteína con base al consumo de sacarosa para cada cepa bajo diferentes transferencias de oxígeno.....	35
Tabla 8.3. Valores máximos de producción de alginato y rendimientos con base al consumo de sacarosa para cada cepa bajo diferentes velocidades de transferencia de oxígeno.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS

CDG	Diguanilato ciclasa
CV	Capacidad viscosificante (en $mPa s L/g_{alginato}$)
c-di-GMP	Bis-(3',5')-monofosfato de guanosina cíclico
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
F6P	Fructosa-6-fosfato
G	Ácido α -L-gulurónico
GDP	Guanosín difosfato
GPC	Cromatografía de Permeación en Gel
GTP	Guanosín trifosfato
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
IP	Índice de polidispersión
k	Índice de consistencia (en $Pa s$)
K_s	Constante de afinidad de la sacarosa
m	Índice de flujo (adimensional)
M	Ácido β -D-manurónico
M1P	Manosa-1-fosfato
M6P	Mansa-6-fosfato
PDE	Fosfodiesterasa
PHB	Poli-3-hidroxi-butirato
PM	Peso molecular
R^2	Ajustes de determinación
TOD	Tensión de oxígeno disuelto
V_G	Velocidad de flujo de aire (en L/h)

V_L	Volumen de trabajo (en L)
V_N	Volumen molar del oxígeno (en L/mol)
VTO	Velocidad de transferencia de oxígeno (en $mmol/L h$)
X_i	Fracción molar del oxígeno a la entrada del reactor
X_o	Ffracción molar del oxígeno a la salida del reactor
$\dot{\gamma}$	Velocidad de deformación (en s^{-1})
η	Viscosidad aparente (en $mPa s$)
μ	Velocidad específica de crecimiento (en h^{-1})

RESUMEN

El alginato es un polisacárido conformado por ácido β -D-manurónico (M) y ácido α -L-gulurónico (G) que tiene varias aplicaciones en la industria alimentaria, en el campo de la ingeniería de tejidos, administración de fármacos y otras aplicaciones biomédicas. Las características de mayor interés del alginato son su capacidad viscosificante (CV) y su alto peso molecular (PM). La cepa mutante AT9 de *Azotobacter vinelandii* ha mostrado un gran potencial para la producción de alginato de alto PM de 3 112 kDa con una alta CV de 1.75 mPa s L/g_{alginato}. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la producción y el PM, así como la CV del alginato producido por la cepa AT9 en comparación con su cepa parental ATCC9046 bajo tres diferentes condiciones de transferencia de oxígeno máxima (VTO_{máx}). Para ambas cepas, el aumento en la VTO_{máx}, en el rango de 3.2 a 12.4 mmol/L h promovió el crecimiento celular medido como acumulación de biomasa, así como producción de proteína. Para la cepa ATCC9046, dicho incremento en la VTO_{máx}, también promovió un incremento en la producción máxima de alginato de 1.5 a 2.9 g/L. Por el contrario, para la cepa AT9, la VTO_{máx} no afectó la producción de alginato, la cual se encontró alrededor de 3.0 g/L. En contraste, el incremento en la VTO_{máx} afectó negativamente el PM del alginato producido por ambas cepas. El mayor PM de 2 927 kDa se obtuvo con la cepa AT9 desde etapas tempranas del cultivo. Otra ventaja que presentó la cepa AT9 sobre la cepa ATCC9046, fue un alta CV de 3.16 mPa s L/g_{alginato}, la cual se obtuvo en condiciones de alta VTO_{máx}. El análisis realizado del efecto de las características físico-químicas del alginato sobre la viscosidad, demostró que ni la concentración, ni el PM, ni el grado de acetilación influyeron en el incremento en la viscosidad del caldo durante el desarrollo del cultivo. Sin embargo, se observó una relación inversa entre la viscosidad y el pH del caldo de cultivo. En general, los resultados obtenidos confirman el potencial de la cepa AT9 para producir alginato de alto PM y CV. También, a través de la VTO_{máx} es posible manipular el PM y la CV sin que la producción de alginato se vea comprometida.

1 . INTRODUCCIÓN

El alginato es un polisacárido conformado por ácido β -D-manurónico y ácido α -L-gulurónico, (Urtuvia *et al.*, 2017). El alginato es producido principalmente por algas cafés (Rhein-Knudsen *et al.*, 2017) y por bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Azotobacter* (Franklin *et al.*, 2011; Urtuvia *et al.*, 2017). El alginato producido por *A. vinelandii* presenta un peso molecular superior a los 1 000 kDa y presenta acetilación en las posiciones 2 y/o 3 de los residuos M (Castillo *et al.*, 2013).

El alginato es utilizado como agente viscosificante en la industria alimentaria (Brownlee *et al.*, 2005). En la industria farmacéutica tiene potencial aplicación como agente para la liberación controlada de fármacos y el diseño de matrices que permitan el anclaje y proliferación celular en ingeniería de tejidos (Sun and Tan, 2013). Sin embargo, el uso del alginato en los diferentes sectores industriales está determinado por sus características químicas, como su PM, el grado de acetilación y/o relación M/G. A su vez, estas características influyen en la capacidad viscosificante del alginato, la cual es la viscosidad que puede alcanzar un litro de solución por un gramo de alginato y que puede ser utilizada como un indicador de la calidad del alginato (Peña *et al.*, 2011). Además, gracias a su alto PM, el alginato es un candidato potencial para su uso en el campo biomédico, ya que dicha característica puede mejorar la biocompatibilidad y la estabilidad de las matrices poliméricas, así como reducir su velocidad de degradación (Polk *et al.*, 1992; Stortz *et al.*, 2009).

La cepa mutante AT9 de *A. vinelandii* ha mostrado potencial para la producción de alginato de una alta capacidad viscosificante (1.75 mPa s L/g_{alginato}) y un alto peso molecular (3 112 kDa), (García *et al.*, 2020). Lo anterior debido a que dicha cepa posee inactivado el gen *mucG* que codifica para la proteína de membrana interna MucG, la cual está involucrada en la regulación de la actividad del complejo alginato polimerasa Alg8-Alg44 (Ahumada-Manuel *et al.*, 2017).

La cepa AT9 se deriva de la cepa silvestre ATCC9046, la cual está definida como una cepa sobreproductora de alginato y con la cual se ha observado que en condiciones de baja transferencia de oxígeno máxima (VTO_{máx} ~ 2 mmol/L h) se favorece la producción de alginato con pesos moleculares alrededor de los 2 000 kDa, respecto a mayores VTOs, en donde el peso molecular se encuentra por debajo de los 1 000 kDa (Reyes *et al.*, 2003; Gómez-Pazarín *et al.*, 2015).

Para la cepa AT9 solo se ha evaluado una condición de $VTO_{m\acute{a}x}$ (5.2 mmol/L h) y dado que posee el mismo fondo genético que la cepa ATCC9046, entonces, cabría esperar que al cultivar a la cepa AT9 en condiciones de VTO por debajo de los 5.2 mmol/L h, esta sería capaz de producir alginato con pesos moleculares por encima de los 3 000 kDa.

Por ello, con el fin de explorar el efecto de la VTO en la producción de alginato con la cepa AT9, el objetivo de este trabajo fue evaluar la producción y el peso molecular, así como la capacidad viscosificante del alginato producido por la cepa AT9 cultivada en condiciones de baja y alta VTO.

2. ANTECEDENTES

2.1 Alginato

El alginato es un polisacárido lineal conformado por monómeros de ácido β -D-manurónico y su epímero en el carbono 5, ácido α -L-gulurónico (Figura 2.1a) unidos por enlaces glucosídicos β -(1 \rightarrow 4) (Figura 2.1b). Típicamente, la composición química del alginato se clasifica en bloques homopoliméricos compuestos por unidades de manuronato o guluronato, bloques M y G, respectivamente y bloques MG, compuestos por cantidades variables de ambos monómeros (Figura 2.1c).

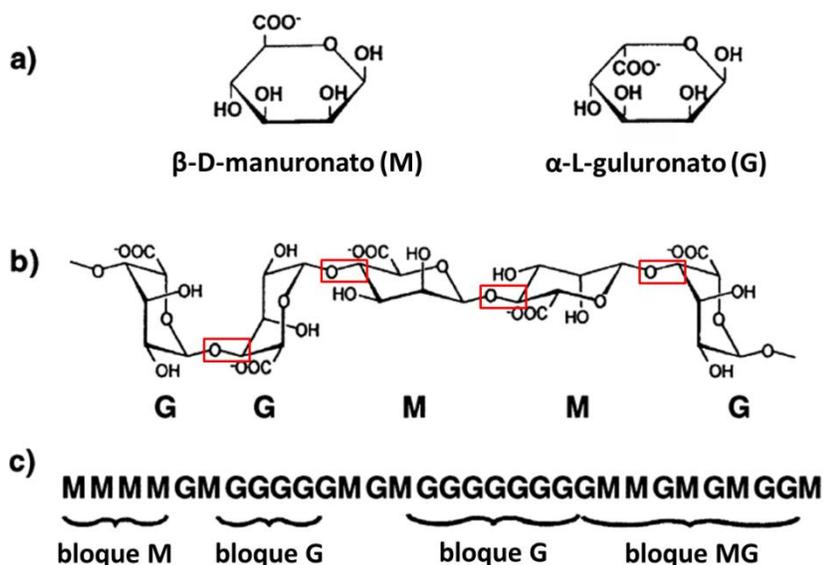


Figura 2.1. Estructura química del alginato. a) Monómeros de ácido β -D-manurónico y α -L-gulurónico, b) conformación de la cadena (los cuadros rojos indican los enlaces β -(1 \rightarrow 4) y c) conformación en bloques. Modificado de Nalamothu *et al.* (2014).

El alginato es producido principalmente por algas pardas de los géneros *Laminaria*, *Ascophyllum*, *Eclonia*, *Lessonia*, *Durvillea*, *Macrocystis*, *Padina* y *Sargasum* como componente de la pared celular (Nalamothu *et al.*, 2014; Rhein-Knudsen *et al.*, 2017) y por bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Azotobacter* como componente de la matriz extracelular (Urtuvia *et al.*, 2017).

2.2 Características químicas y físicas del alginato

A nivel comercial, el alginato se obtiene a través de la recolección de algas cafés. Sin embargo, actualmente se están explorando y desarrollando nuevas estrategias para la producción de alginato a partir de cultivos bacterianos en biorreactores (Galindo *et al.*, 2007; Malaki *et al.*, 2016; Urtuvia *et al.*, 2017).

Tanto el alginato producido por algas, como el alginato producido por bacterias presenta variación en sus características químicas, como en su relación M/G, distribución de residuos M y G, peso molecular y grado de acetilación. En el alginato producido por algas, estas características van a depender de la especie, edad de las algas y ubicación geográfica y temporalidad en que son cosechadas (Rehm and Moradali, 2018; Storz *et al.*, 2009). En bacterias, la especie y las condiciones de cultivo van a determinar dichas características.

La característica funcional más importante del alginato, es su capacidad de formar geles, la cual se da por entrecruzamiento de cadenas y que puede mejorar por la presencia de residuos de guluronato. Estos residuos poseen afinidad por iones divalentes ($Mg^{+2} < Ca^{+2} < Sr^{+2} < Ba^{+2}$) que pueden participar en la unión iónica intercatenaria entre bloques G, actuando como reticuladores que estabilizan las cadenas del polímero, formando una red tridimensional, lo que da origen a la formación de geles, los cuales contienen cadenas reticuladas intercaladas con cadenas móviles que se unen y atrapan grandes cantidades de agua (Rezende *et al.*, 2007; Rhein-Knudsen *et al.*, 2017). Estas interacciones formadas entre los residuos G y los iones divalentes, típicamente se describen a través del modelo de caja de huevo (Figura 2.2).

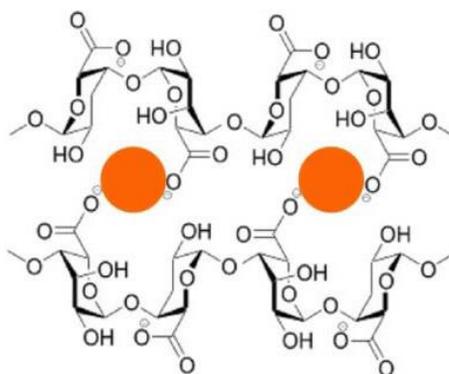


Figura 2.2. Modelo caja de huevo. Interacción iónica entre residuos G del alginato e iones divalentes (círculos naranjas). Tomado de Sun and Tan (2013).

La distribución de manuronato y guluronato y la relación M/G impactan en la capacidad gelificante del alginato. De esta forma, el alginato con alto contenido de guluronato forma geles duros y quebradizos, en comparación al alginato con alto contenido de manuronato que forma geles más suaves y flexibles (Rhein-Knudsen *et al.*, 2017).

Adicionalmente, el grado de acetilación del alginato también afecta la capacidad gelificante por expansión de la cadena y disminución de la afinidad por el calcio (Skjåk-Bruek *et al.*, 1989).

El alginato es soluble en agua y en solución, el pH del disolvente determina la solubilidad del polímero por la presencia de cargas electrostáticas en los residuos M y G (Nalamothu *et al.*, 2014). Se sabe que, la disminución del pH tiende a aumentar la viscosidad del alginato en solución (Bu *et al.*, 2005; Masuelli and Illanes, 2014). Cuando el alginato se encuentra disuelto, predominan dos tipos de interacciones: la repulsión electrostática entre los grupos carboxilato ionizados y los puentes de hidrógeno formados entre el ácido carboxílico y los grupos carboxilato ionizados. A mayores valores de pH, se promueve la disociación de los grupos de ácido carboxílico, lo que conduce a la relajación de la red de alginato; mientras que, a menores valores de pH, el debilitamiento de las interacciones electrostáticas permite la formación de puentes de hidrógeno, generando un mayor grado de entrecruzamiento y un mayor grado de reticulación. De acuerdo a lo anterior, el comportamiento reológico de la solución, responde a cambios en el pH (Bu *et al.*, 2005; Masuelli and Illanes, 2014).

Cuando se encuentra en solución, el alginato posee la capacidad de incrementar la viscosidad de la solución dependiendo de la concentración y el peso molecular del polímero. Tanto el incremento en la concentración de alginato, así como el incremento en el peso molecular del mismo, van a conducir a un aumento en la viscosidad de la solución. Sin embargo, se ha observado que el peso molecular tiene mayor impacto en la viscosidad, ya que el alginato de mayor peso molecular (2 000 kDa), permite generar soluciones más viscosas a menores concentraciones, en comparación con el alginato de menor peso molecular (200 kDa) y mayores concentraciones (Figura 2.3).

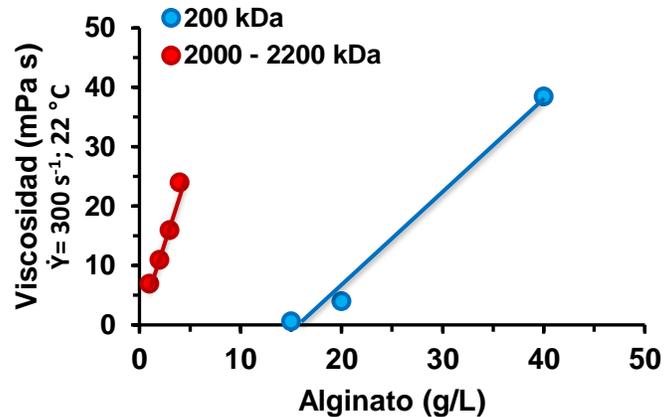


Figura 2.3. Efecto de la concentración y el peso molecular del alginato sobre la viscosidad. Tomado de Gómez-Pazarín *et al.* (2015) y Vicini *et al.* (2018).

2.3 Aplicaciones del alginato

Debido a que el alginato es una sustancia no tóxica, comestible, biodegradable y no inmunogénica, aunado a su capacidad de formar geles y de incrementar la viscosidad de las soluciones, el alginato es utilizado en una gran variedad de aplicaciones industriales. Principalmente, se utiliza en la industria alimentaria como un agente estabilizante, espesante y gelificante (Brownlee *et al.*, 2005). Aunque también ha mostrado potencial para el desarrollo de matrices poliméricas que permitan la liberación controlada de fármacos y en el anclaje y crecimiento celular en ingeniería de tejidos (Sun and Tan, 2013). En la Tabla 2.1 se muestra el uso del alginato en los diferentes sectores industriales.

La aplicación del alginato en los diferentes sectores industriales depende de sus características fisicoquímicas, principalmente de su peso molecular. En la Tabla 2.2, se muestra el uso del alginato en los diferentes sectores industriales, en función de su peso molecular.

Específicamente, en relación a su uso para la liberación de fármacos y en ingeniería de tejidos, el incremento en el peso molecular del polímero reduce la velocidad de liberación de fármacos y además tiene menor velocidad de degradación (Fabia *et al.*, 2005; Polk *et al.*, 1992).

Tabla 2.1. Aplicaciones del alginato en los diferentes sectores industriales.
(Adaptado de Draget *et al.*, 2005; Lee and Mooney, 2012).

Aplicación	Uso
Alimentaria	Agente estabilizante de bebidas alcohólicas Agente gelificante Agente viscosificante Fuente de fibra dietética
Farmacéutica	Emulsificante y espesante Gel absorbente Agente de suspensión Estabilizante de emulsiones
Biocientífica	Soporte en biocatalizadores Ingeniería de tejidos
Odontología	Impresiones dentales Curación de heridas Inmunoestimulantes Material de implantación
Papel	Mejorar la uniformidad de la superficie
Industria textil	Fijador del color y brillo Agente viscosificante de tintas
Cosmética	Agente emulsificante
Agricultura	Agente de retención de agua
Tratamiento de aguas	Agente quelante Incrementa el tamaño de los agregados en los procesos de floculación

Tabla 2.2. Aplicación del alginato en función de su peso molecular.
(Adaptado de Pacheco-Leyva *et al.*, 2016).

Peso molecular (kDa)	Aplicación
15 – 120	Antioxidante Andamios para tejido celular Antibacteriano Suplemento dietético Inmovilización celular
120 - 290	Estabilizador y conservante de alimentos Estabilidad de almacenamiento y microencapsulación Antibacteriano Biorremediación Cicatrización de heridas
500 - 1000	Modulación de la actividad enzimática Compuesto de tabletas de liberación prolongada

2.4 Biosíntesis de alginato por *A. vinelandii*

A. vinelandii es una bacteria Gram negativa estrictamente aerobia, capaz de fijar nitrógeno en condiciones de diazotrofia y en condiciones de alta disponibilidad de oxígeno. Produce dos polímeros de interés industrial, el alginato y el poli-3-hidroxibutirato (PHB). Posee un metabolismo heterótrofo, por lo que utiliza azúcares, alcoholes y ácidos orgánicos como fuentes de carbono. Los azúcares como la sacarosa pueden ser metabolizados a través de la vía Entner-Doudoroff (Still and Wangm *et al.*, 1964).

A. vinelandii posee la capacidad de formar quistes durante la fase estacionaria o las células vegetativas pueden ser inducidas con *n*-butanol al 0.2 % para formar quistes (Lin and Sandoff, 1968). Uno de los componentes principales de estos quistes, es el alginato, que le confiere resistencia a la desecación (Sandoff, 1975).

La síntesis de alginato por *A. vinelandii* se divide en 4 pasos: síntesis del precursor, polimerización, modificación y exportación (Figura 2.4).

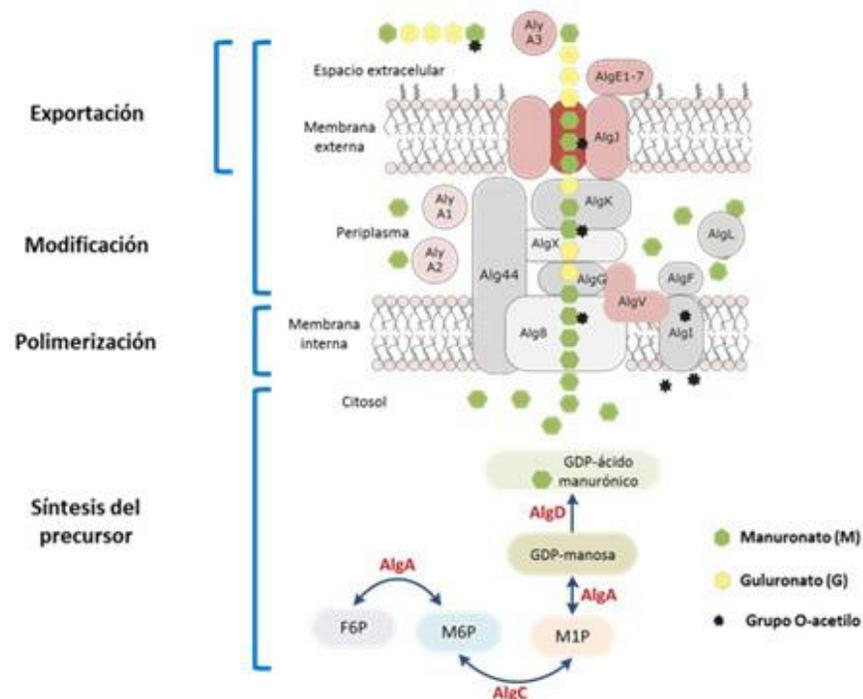


Figura 2.4. Representación esquemática de la biosíntesis de alginato por *Azotobacter vinelandii*. Modificado de Urtuvia *et al.* (2017).

A través de la vía Entner-Doudoroff, *A. vinelandii* puede asimilar la glucosa y dirigir la fuente de carbono hacia la síntesis de alginato (Still and Wang *et al.*, 1964). La síntesis del precursor activado (GDP-ácido manurónico) del alginato se lleva a cabo en el citosol. La actividad fosfomanosa isomerasa de AlgA cataliza la isomerización de fructosa-6-fosfato (F6P) a manosa-6-fosfato (M6P), posteriormente la fosfomanomutasa AlgC isomeriza la M6P a manosa-1-fosfato (M1P). En este punto, la actividad GDP-manosa pirofosfatasa de AlgA cataliza la hidrólisis del GTP de la M1P para formar GDP-manosa, la cual es oxidada por AlgD, una GDP-manosa deshidrogenasa, al precursor activado GDP-ácido manurónico (Hay *et al.*, 2013).

La polimerización de GDP-ácido manurónico es llevada a cabo por un complejo de polimerización conformado por una glicosil transferasa Alg8 y una co-polimerasa Alg44, ambas proteínas se encuentran ubicadas en la membrana interna. Este complejo de polimerización es activado mediante la unión del segundo mensajero c-di-GMP a un dominio PilZ en Alg44 (Urtuvia *et al.*, 2017).

La glicosiltransferasa Alg8 controla la transferencia de ácido manurónico del precursor activado a la cadena de alginato en crecimiento. La catálisis en esta reacción de polimerización implica una inversión de la configuración anomérica en el centro de reacción, ya que los sustratos (GDP-ácido manurónico y la cadena de alginato en crecimiento) son azúcares difosfo de nucleótidos con enlaces α que forman un producto con un enlace β (Remminghorst, 2007).

El ácido polimanurónico resultante es transportado al periplasma por un andamiaje de proteínas conformado por AlgX, AlgG y AlgK. Una vez en el periplasma, algunos de los residuos de manuronato pueden modificarse a través de la adición de grupos acetilo en las posiciones 2 y/o 3. Esta reacción de acetilación es llevada a cabo por un complejo acetilasa compuesto por AlgI, AlgV y AlgF y por la acción de la proteína AlgX (Urtuvia *et al.*, 2017; Riley *et al.*, 2013).

Los residuos de manuronato no acetilados pueden ser epimerizados a guluronato mediante la acción de AlgG, una epimerasa que también se ubica en el periplasma, y por siete epimerasas de manuronato C-5 homólogas (AlgE1 – E7), localizadas en el espacio extracelular (Ertesvag, 2015).

Adicionalmente, AlgG junto con AlgX y AlgK tienen función estructural para transportar la cadena de polímero hasta AlgJ, una porina ubicada en la membrana externa, que secreta la cadena de alginato hacia el exterior de la célula (Urtuvia *et al.*, 2017).

2.5 Influencia de la disponibilidad de oxígeno sobre la producción de alginato

La velocidad de transferencia de oxígeno máxima y la tensión de oxígeno disuelto (TOD) son parámetros importantes que determinan la producción y las características físicas y químicas del alginato.

Para *A. vinelandii*, la concentración crítica de oxígeno (definida como la concentración de oxígeno disuelto a la que la velocidad específica de crecimiento es el 95% de la tasa máxima de crecimiento) es del 4 %, por lo que tensiones de oxígeno disuelto por arriba y por debajo de este valor se denominan condiciones de limitación y no limitación de oxígeno, respectivamente (Flores *et al.*, 2013). Una condición de limitación de oxígeno es aquella en la que la velocidad de transferencia de oxígeno máxima no satisface el consumo de oxígeno del cultivo (García-Ochoa *et al.*, 2010).

Cuando *A. vinelandii* es cultivada en condiciones de no limitación de oxígeno (TOD = 5 %) y en presencia de una fuente de nitrógeno, produce alginato con pesos moleculares de 42 kDa; mientras que, en condiciones de limitación de oxígeno (TOD = 1 %), los pesos moleculares se encuentran por encima de los 1 000 kDa (Flores *et al.*, 2013).

Díaz-Barrerra *et al.* (2007) evaluaron el efecto de la velocidad de transferencia de oxígeno máxima en condiciones de diazotrofia sobre el peso molecular del alginato producido por la cepa ATCC9046 de *A. vinelandii* en reactores de 3 L en condiciones de baja transferencia de oxígeno máxima. Cuando la VTO máxima del sistema se incrementó de 3 a 9 mmol/L h, la producción de alginato también incrementó de 0.5 a 1.5 g/L. Sin embargo, este incremento afectó negativamente el peso molecular que disminuyó de 1 560 a 220 kDa, para dichos valores de $VTO_{m\acute{a}x}$.

Este comportamiento también se ha observado en matraces agitados, ya que cuando la $VTO_{m\acute{a}x}$ es de 1 mmol/L h, la concentración de alginato es de casi 2 g/L, en comparación con una mayor $VTO_{m\acute{a}x}$ de 6 mmol/L, en donde la concentración se encontró entre 5 y 6 g/L. Este incremento en la

VTO_{máx} condujo a una disminución del peso molecular de 2 200 a casi 1 700 kDa (Peña *et al.*, 2011; Gómez-Pazarín *et al.*, 2015).

2.6 A. *vinelandii* AT9

A. vinelandii AT9 es una cepa mutante derivada de la cepa silvestre ATCC9046, que tiene inactivado el gen *mucG*. Este gen codifica para la proteína de membrana interna MucG, la cual posee un dominio fosfodiesterasa (PDE) y otro dominio de diguanilato ciclasa (CDG), este último inactivo; de esta manera MucG está involucrada en la degradación del segundo mensajero bis-(3',5')-monofosfato de guanosina cíclico (c-di-GMP).

c-di-GMP es una molécula intracelular pequeña y difusible utilizada por las bacterias para convertir estímulos ambientales en una respuesta celular (Mills *et al.*, 2011). c-di-GMP se sintetiza a partir de GTP por acción de DGC. El c-di-GMP se une específicamente a moléculas efectoras que actúan como sensores que detectan señales internas o externas que pueden modular respuestas celulares a nivel transcripcional, traduccional y post-traduccional (Mills *et al.*, 2011; Hengger *et al.*, 2019).

Este segundo mensajero es esencial para la activación del complejo de polimerización del alginato Alg8-Alg44, por unión al dominio PilZ de Alg44, lo que regula post-traduccionalmente la actividad de la polimerasa Alg8 (Ahumada-Manuel *et al.*, 2017). De esta manera, la cepa mutante AT9 es capaz de producir alginato de mayor peso molecular, respecto a su cepa parental.

En cultivos desarrollados en matraces agitados con la cepa GG9 (mutante derivada de la cepa silvestre AEIV de *A. vinelandii* que posee la misma mutación que la cepa AT9), la producción de alginato se incrementó dos veces (2.6 g/L), respecto a lo producido (1.3 g/L) por su cepa parental (Ahumada-Manuel *et al.*, 2017). Mientras que con la cepa silvestre AEIV, el peso molecular promedio del alginato fue de 596 kDa. En ausencia de MucG el peso molecular promedio del alginato incrementó a 1 451 kDa.

De lo anterior se concluyó que la ausencia de la actividad fosfodiesterasa de MucG condujo a un aumento en la concentración del segundo mensajero c-di-GMP, lo que provoca una mayor actividad del complejo Alg8-Alg44 dando como resultado la síntesis de alginato de mayor peso molecular.

García *et al.* (2020) evaluaron el potencial de la cepa AT9 para la producción de alginato de alto peso molecular en cultivos en matraces agitados bajo condiciones de microaerofilia ($VTO_{m\acute{a}x} = 5.2$ mmol/L h). La concentración de alginato alcanzada fue de 3.8 ± 0.2 g/L con pesos moleculares por encima de los 3 000 kDa y una capacidad viscosificante de 1.75 ± 0.08 mPa s L/g de alginato.

Hay que recordar que la cepa AT9 posee el mismo fondo genético que la cepa silvestre ATCC9046, la cual es considerada como sobre productora de alginato y con la cual, las mayores pesos moleculares se presentan en condiciones de velocidad de transferencia de oxígeno máxima por debajo de los 5 mmol/L h (Díaz-Barrera *et al.*, 2007; Peña *et al.*, 2011; Gómez-Pazarín *et al.*, 2015); por lo que la cepa AT9 cultivada en condiciones de baja transferencia de oxígeno máxima ($VTO_{m\acute{a}x} < 5$ mmol/L h) podría permitir la producción de alginato de alto peso molecular (PM > 3 000 kDa).

2.7 Biosíntesis de PHB por *A. vinelandii*

A. vinelandii también es capaz de producir PHB, el cual es un homopolímero intracelular de la familia de los polihidroxicanoatos, conformado por monómeros de 3-hidroxibutirato. El PHB es sintetizado en respuesta a un exeso de carbono y almacenado en cuerpos de inclusión denominados gránulos de PHB, como una reserva de fuente de carbono y de energía (Gómez, E., 2020).

La síntesis de este polímero está relacionada con el metabolismo energético, que a la vez se ve influenciado por la disponibilidad de oxígeno (Castillo *et al.*, 2020); por lo que la evaluación de la producción del PHB puede ayudar a comprender el uso de la fuente de carbono por la bacteria.

3. JUSTIFICACIÓN

La ausencia de la actividad fosfodiesterasa de la proteína MucG en la cepa AT9 de *A. vinelandii* conduce a un aumento en la concentración del segundo mensajero c-di-GMP, involucrado en la activación del complejo de polimerización de alginato Alg8-Alg44, lo que resulta en la síntesis de alginato con pesos moleculares de hasta 3 100 kDa.

Con la cepa parental, la ATCC9046, el uso de condiciones de baja transferencia de oxígeno máxima ($VTO_{m\acute{a}x} < 5 \text{ mmol/L h}$) permite la producción de alginato con pesos moleculares por encima de los 2 000 kDa; por lo que se espera que el uso de la cepa AT9 en condiciones de limitación de oxígeno permitirá la producción de alginato con pesos moleculares superiores a los 3 000 kDa.

Adicionalmente, la caracterización cinética de la producción de alginato por la cepa AT9 permitirá optimizar las condiciones de cultivo para la producción de alginato de alto peso molecular, derivado del interés biotecnológico que existe para su aplicación en las industrias farmacéuticas y biomédicas.

4. HIPÓTESIS

El empleo de condiciones de cultivo de baja transferencia de oxígeno máxima en el intervalo de 2 a 5 mmol/L h en cultivos de la cepa AT9 de *A. vinelandii* permitirá obtener alginato con pesos moleculares iguales o superiores a los obtenidos con el alginato producido con la cepa parental.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Realizar cultivos lote en reactores de 3 L con la cepa AT9 de *A. vinelandii* bajo diferentes condiciones de transferencia de oxígeno máxima en un intervalo de 2 a 15 mmol/L h, a través de cambios en la velocidad de agitación para evaluar el potencial de la cepa AT9 para la síntesis de alginato de alto peso molecular ($PM \geq 3\ 000\ \text{kDa}$).

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Generar tres diferentes velocidades de transferencia de oxígeno máxima para evaluar su efecto sobre la producción y el peso molecular del alginato producido por la cepa AT9.
2. Analizar la evolución del peso molecular del alginato a través del tiempo de cultivo y su relación con la cantidad producida para determinar la influencia que tienen dichas propiedades sobre la capacidad viscosificante del polímero.
3. Conocer el peso molecular y el grado de acetilación del alginato producido por la cepa AT9 para evaluar su contribución a la viscosidad del caldo de cultivo y a la calidad del producto.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Se evaluó la producción de alginato y se analizaron sus características fisicoquímicas (peso molecular, grado de acetilación y capacidad viscosificante) en cultivos con las cepas AT9 y ATCC9046 de *A. vinelandii* en reactor de 3 L bajo condiciones de transferencia de oxígeno máxima entre 2 y 15 mmol/L h.

Para generar diferentes velocidades de transferencia de oxígeno máxima se utilizaron diferentes velocidades de agitación entre 200 y 500 rpm, sin control de la TOD.

El medio de cultivo utilizado fue el medio Burk modificado reportado por Peña *et al.* (2011) y el cual contiene sacarosa como fuente de carbono y extracto de levadura como fuente de nitrógeno.

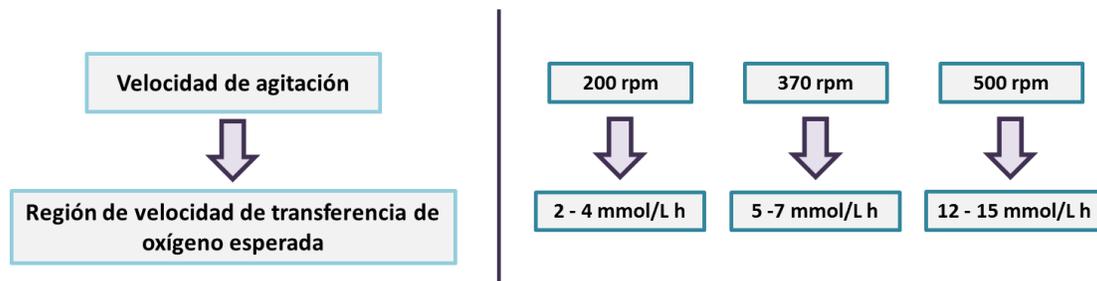


Figura 6.1. Estrategia experimental seguida durante el desarrollo del presente trabajo.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Cepas de *Azotobacter vinelandii* y preservación de cepas

Los experimentos se desarrollaron utilizando la cepa silvestre de *Azotobacter vinelandii* ATCC9046 y la mutante AT9, carente de la proteína de membrana interna MucG (Ahumada-Manuel *et al.*, 2017).

Las cepas se conservaron en glicerol al 80 %, a una temperatura de -70 °C. La preparación de la suspensión celular en glicerol se realizó de la siguiente manera. La bacteria se creció en un matraz de 500 mL con 100 mL de medio Burk enriquecido con sacarosa y extracto de levadura (sección 7.2) a 200 rpm y 29 °C por 24 horas. El caldo de cultivo se mezcló, en condiciones estériles, con una suspensión acuosa de glicerol al 80 % (p/v), en una relación 1:1 (suspensión celular: glicerol).

Para la activación de la cepa para la generación del inóculo, del glicerol se tomaron dos azadas y se estriaron en una caja Petri con medio Burk modificado. Para el caso de la cepa AT9, al medio Burk modificado se le agregó espectinomicina en una concentración de 30 µg/mL. Las cajas inoculadas se incubaron a 29 °C por 48 horas o hasta alcanzar un crecimiento celular suficiente para sembrar tres cajas Petri.

7.2 Medio de cultivo

Se utilizó el medio Burk modificado con sacarosa y extracto de levadura. La composición del medio se muestra en la tabla 7.1.

Para la preparación del medio se elaboraron tres soluciones: Solución A (CaSO₄), Solución B (NaCl, MgSO₄, Na₂Mo y FeSO₄) y Solución C (K₂HPO₄, KH₄PO₄, MOPS, extracto de levadura y sacarosa), a esta última se le ajustó el pH a 7.2 con NaOH 2 N. Las tres soluciones se esterilizaron a 121 °C por 20 minutos y posteriormente se mezclaron en condiciones estériles.

Las soluciones A y B representaron, cada una, el 10 % del volumen de trabajo; mientras que la solución C representó el 70 % del volumen de trabajó. El 10 % restante estuvo conformado por el inóculo.

Tabla 7.1. Composición del medio Burk-sacarosa y extracto de levadura

Componente	Concentración (g/L)
CaSO ₄	0.05
NaCl	0.2
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.2
Na ₂ Mo 2H ₂ O	0.0029
FeSO ₄ 7H ₂ O	0.027
K ₂ HPO ₄	0.66
KH ₂ PO ₄	0.16
MOPS	1.42
Extracto de levadura	3
Sacarosa	20
Agar (solo para medio sólido)	18

7.3 Generación del inóculo

El desarrollo del inóculo se realizó en dos etapas. En la primera etapa se tomó una azada de las cepas crecidas en las cajas Petri para su activación y se estrió en nuevas caja Petri con medio Burk modificado, dichas cajas se incubaron a 29 °C por 48 h.

En la segunda etapa, se tomaron dos azadas de las colonias formadas en la caja Petri, las cuales se resuspendieron en un matraz de 500 mL con 100 mL de medio Burk modificado y se incubó a 200 rpm a 29 °C por 20 – 24 horas hasta alcanzar una absorbancia de 0.16 ± 0.02 ($\lambda = 540$ nm, con una dilución 1:50). El volumen del inóculo fue de 10 % del volumen de trabajo.

7.4 Cultivos lote en biorreactor

Los cultivos se desarrollaron en biorreactores Applikon de 3 L con un volumen de trabajo de 2 L, equipado con dos turbinas Rushton de 6 paletas planas. La relación entre el diámetro del impulsor

y el diámetro del tanque (D/T) fue de 0.35. La velocidad de aireación fue de 1 L/min y se efectuó por burbujeo a través de un difusor de 7 orificios al fondo del reactor.

Los cultivos se desarrollaron a 29 °C por 72 horas, sin control de oxígeno disuelto ni pH y utilizando tres velocidades de agitación: 200, 370 y 500 rpm.

La tensión de oxígeno disuelto se monitoreo con un electrodo polarográfico de oxígeno AppliSens y el pH se monitoreo con un sensor de pH AppliSens.

7.5 Determinación de la Velocidad de transferencia de oxígeno máxima

La velocidad de transferencia de oxígeno máxima se determinó por el análisis de gases a la entrada y salida del biorreactor con un analizador de gases Teledyne Analytical Instruments.

Para calcular la VTO se utilizó la siguiente ecuación:

$$VTO = \frac{V_G}{V_L V_N} (X_i - X_o)$$

En donde VTO es la velocidad de transferencia de oxígeno (en $mmol/L h$), V_G es la velocidad de flujo de aire (en L/h), V_L es el volumen de trabajo (en L), V_N es el volumen molar del oxígeno (en L/mol), X_i es la fracción molar del oxígeno a la entrada del reactor y X_o es la fracción molar del oxígeno a la salida del reactor.

7.6 Métodos analíticos

7.6.1 Determinación de la concentración de proteína soluble

La proteína se determinó por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951), el cual es un método colorimétrico, siendo la intensidad de la coloración proporcional a la concentración de proteína. Durante la reacción se forma un complejo Cu^{+2} -proteína, entre los iones Cu^{+2} de la solución reactiva y el nitrógeno de los enlaces peptídicos de la proteína, y exponiendo los residuos fenólicos de tirosina, los cuales reducen al ácido túngstico del reactivo de Folin.

Se preparó una solución A (con Na₂CO₃ al 2 % en NaOH 0.1 N), una solución B (con tartrato de Na y K al 2 %) y una solución C (con CuSO₄ al 1 %), con las cuales se preparó una solución reactiva (1 % de solución C, 1 % de solución B y 98 % de solución A). La solución reactiva se preparó al momento de su uso.

Curva de calibración

Se preparó una curva de calibración con estándares de albúmina bovina (SIGMA) de acuerdo con las siguientes concentraciones: 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 g/L.

Para el procesamiento de la curva de calibración se procedió de la siguiente manera:

1. En un tubo de 1.5 mL se colocaron 200 µL de estándar y 1 mL de solución reactiva (recién preparada), se agitó en un vórtex y se dejó reposar por 10 minutos.
2. Se adicionaron 100 µL de reactivo de Folin y fenol de Ciocalteu diluido en agua (relación 1:1) y se agitó en vórtex. Se dejó reaccionar en oscuridad por 30 minutos. Posteriormente, se centrifugó a 11 000 rpm por 2 minutos.
3. La absorbancia se determinó a una longitud de onda de 625 nm en un espectrofotómetro (Genesys 10s UV-VIS).
4. Para la elaboración del blanco se utilizó agua desionizada y se procesó de la misma manera en que se procesaron los estándares.

La ecuación de la curva para la determinación de proteína fue:

$$Proteína \left(\frac{g}{L} \right) = \frac{Absorbancia_{625\text{ nm}} - 0.0327}{1.2464}$$

Procesamiento de las muestras

1. Se tomó 1 mL de muestra y se centrifugó a 11 000 rpm por 20 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en 1 mL de agua destilada. La solución resultante se diluyó en caso de ser necesario.

2. El procesamiento de las muestras se realizó de la misma forma en que se procesaron los estándares.

7.6.2 Determinación de biomasa por masa seca

La concentración de biomasa total se determinó por masa seca de acuerdo al método reportado por Gómez-Pazarín (2015).

1. En tubo de 5 mL se colocaron 3 mL de muestra y se adicionaron 300 μ L de solución de NaCl 1 M y 300 μ L de solución de Na₂EDTA 0.1 M. Se mezcló y se centrifugó a 11 000 rpm a 25 °C por 20 minutos.
2. Se eliminó el sobrenadante y el paquete celular se recuperó y se filtró con membranas de 0.45 μ m, previamente llevadas a peso constante.
3. Las membranas con la biomasa húmeda se secaron a 80 °C por 24 horas, hasta alcanzar un peso constante.
4. Las membranas con biomasa seca se enfriaron por dos horas en desecador al vacío.
5. Finalmente, se pesaron y el peso de la biomasa se determinó por diferencia de masa.

7.6.3 Consumo de sacarosa

La concentración de sacarosa se determinó por el método de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) (Miller G., 1959), el cual se basa en la determinación de grupos carbónicos libres de los azúcares reductores, a través de una reacción redox entre el ácido 3,5-dinitrosalicílico y los azúcares reductores, dando como producto ácido 3-amino, 5-nitrosalicílico que provoca una coloración marrón oscuro cuya intensidad es proporcional a la cantidad de azúcares reductores.

Se preparó una solución de DNS conformada por NaOH 16 g/L, tartrato de sodio y potasio 300 g/L y DNS 10 g/L, cada componente se adicionó a la solución en el orden mencionado. Para el caso del DNS, la solución se calentó y el DNS se adicionó lentamente para evitar precipitación.

Se preparó una solución de amortiguador de citratos con un pH de 4.6. Se preparó una solución de ácido cítrico 3.9 g/L a la cual se le adicionó lentamente una solución de citrato de sodio 182 g/L hasta alcanzar un pH de 4.6.

Se preparó una solución enzimática de β -fructofuranosidasa (marca Gist-Brocades, con una actividad de 243 U/mg a 40 °C). Se pesaron 2.5 mg de la enzima y se disolvieron en 1 mL de amortiguador de citratos.

Se preparó una curva de calibración con estándares de sacarosa de acuerdo con las siguientes concentraciones: 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 g/L.

Para el procesamiento de la curva de calibración se procedió de la siguiente manera:

1. En un tubo de 1.5 mL se colocaron 90 μ L de estándar y 10 μ L de solución enzimática, se agitó en vórtex y se dejó reaccionar por 10 minutos a temperatura ambiente.
2. Se adicionaron 100 μ L de DNS, se agitó en vórtex y el tubo se sumergió en agua en ebullición por 5 minutos e inmediatamente después se colocó en hielo para detener la reacción.
3. Se agregó 1 mL de agua desionizada y se agitó en vórtex.
4. La absorbancia se midió a una longitud de onda de 540 nm en un espectrofotómetro (Genesys 10s UV-VIS).
5. Para la elaboración del blanco, se utilizó agua destilada y se procesó de la misma manera en que se procesaron los estándares.

La ecuación de la curva para la determinación de sacarosa fue:

$$\text{Sacarosa} \left(\frac{\text{g}}{\text{L}} \right) = \frac{\text{Absorbancia}_{540 \text{ nm}} + 0.0068}{0.3849}$$

Procesamiento de las muestras

1. El consumo de sacarosa se midió en el caldo de cultivo libre de células, por lo que las muestras se centrifugaron a 11 000 rpm por 20 minutos a 25 °C. Se recuperó el sobrenadante y se realizó una dilución con agua destilada en una relación 1:20.
2. El procesamiento se realizó de la misma forma en que se procesaron los estándares.

7.6.4 Determinación espectrofotométrica de alginato por el método de carbazol

La producción de alginato se determinó a través de la cuantificación espectrofotométrica de ácidos urónicos con carbazol de acuerdo al método reportado por Ahumada-Manuel *et al.* (2017).

Se preparó una solución de borato/ácido sulfúrico de la siguiente manera: se pesaron 24.7 g de ácido bórico y se disolvieron en 30 mL de agua desionizada con poca agitación y ligero calentamiento. Se añadieron 10.09 g de KOH para disolver completamente el ácido bórico y se llevó a un volumen de 45 mL con agua desionizada tibia para impedir precipitación de borato. Finalmente, a 975 mL de H₂SO₄ concentrado se le añadieron lentamente 25 mL de la solución de borato. La solución final se conservó en refrigeración y en oscuridad.

Se preparó una solución de carbazol al 0.1 % en etanol absoluto.

Se preparó una curva de calibración con estándares de alginato algal de acuerdo con las siguientes concentraciones: 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 g/L.

Para el procesamiento de la curva de calibración se procedió de la siguiente manera:

1. En un tubo de 1.5 mL, se colocaron 200 µL de estándar y se colocaron en hielo.
2. A cada tubo se le agregó 1 mL de solución fría de borato/ácido sulfúrico.
3. Posteriormente se añadieron 100 µL de solución de carbazol y se agitaron por 10 segundos.
4. Los tubos se calentaron a 55 °C por 30 min y posteriormente se dejaron enfriar a temperatura ambiente.
5. La absorbancia se midió a una longitud de onda de 530 nm en un espectrofotómetro (Genesys 10s UV-VIS).
6. Para la elaboración del blanco, se utilizó agua destilada y se procesó de la misma manera en que se procesaron los estándares.

La ecuación de la curva para la determinación de alginato algal fue:

$$\text{Alginato} \left(\frac{g}{L} \right) = \frac{\text{Absorbancia}_{530 \text{ nm}} + 0.0514}{2.2652}$$

Procesamiento de las muestras y determinación del contenido de alginato

1. En un tubo de 1.5 mL se colocó 1 mL de caldo de cultivo y se centrifugó a 11 000 rpm por 20 minutos a 25 °C.
2. Se recuperó el sobrenadante y se colocó en un tubo de con 3 mL de 2-isopropanol. Se agitó en vórtex y la mezcla se dejó reposar por 24 horas a 4 °C, para favorecer la precipitación del alginato.
3. Se recuperó el alginato precipitado y se colocó en tubos de 2 mL. Dichos tubos con el alginato, se colocaron en una centrífuga al vacío a 60 °C por 24 h para secar el alginato.
4. El alginato seco se resuspendió en 1 mL de agua desionizada.
5. El alginato reconstituido se procesó de la misma forma en que se procesaron los estándares.

7.6.5 Determinación del peso molecular del alginato

El peso molecular del alginato se determinó por cromatografía de permeación en gel (GPC, por sus siglas en inglés), de acuerdo con el método reportado por Peña *et al.* (1997).

Se utilizó una serie de columnas ultrahidrogel 500 y una columna lineal (Waters) acopladas a un equipo de HPLC con un detector de índice de refracción (Waters 2414). Como fase móvil se utilizó NaNO₃ 0.1 M a una temperatura de 35 °C, con un flujo de 0.9 mL/min. El volumen de inyección de los estándares y las muestras fue de 100 µL.

Como referencia del peso molecular se utilizaron pululanos de *Aureobasidium pullulans* con pesos moleculares de 5 – 2 500 kDa. Cabe mencionar que no se contó con estándares con pesos moleculares superiores a los 2 500 kDa, por lo que los pesos moleculares del alginato por encima de dicho valor fueron valores extrapolados a la curva de calibración estándar.

El procesamiento de las muestras se realizó de la siguiente manera:

1. Se realizaron los pasos 1 -3 de la sección 7.6.4
2. Se pesaron 1 – 3 mg de alginato seco y se resuspendió en 1 mL de agua desionizada.

7.6.6 Determinación del grado de acetilación del alginato

El grado de acetilación del alginato se determinó por presencia de grupos acetilo por HPLC, de acuerdo al método reportado por Gómez-Pazarín (2015).

Se utilizó una columna Aminex 87H acoplada a un equipo de HPLC con un detector de arreglo de diodos (Waters 2996). Como fase móvil se utilizó H₂SO₄ 7 mM a una temperatura de 50 °C, con un flujo de 0.65 mL/min. El volumen de inyección de las muestras fue de 100 µL.

Se preparó una curva de calibración con estándares de acetato de sodio de acuerdo con las siguientes concentraciones: 0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 y 0.1 g/L.

La ecuación de la curva para la determinación de grupos acetilo fue:

$$\text{Grupos acetilo } \left(\frac{g}{L}\right) = \frac{\text{Area} + 3\,896.76}{1\,757\,829.56}$$

El procesamiento de las muestras se realizó de la siguiente manera:

1. Se realizaron los pasos 1 -3 de la sección 7.6.4
2. Se pesaron 5 – 10 mg de alginato seco y se resuspendió en 500 µL de agua desionizada.
3. Se adicionaron 500 µL de NaOH 1 N, se mezcló y se dejó reaccionar a 80 °C por 2 horas.
4. Posteriormente, las muestras se enfriaron y se acidificaron con 625 µL de H₃PO₄ 1.5 M.
5. El contenido de ácido acético se determinó por absorción de luz UV a una longitud de onda de 210 nm.

7.6.7 Determinación de la viscosidad del caldo de cultivo

La viscosidad del caldo de cultivo se determinó a través de ensayos reológicos de acuerdo a lo reportado por Peña *et al.* (2011).

Se utilizó un reómetro AR 1000 (TA Instruments) con una geometría de cono y plato, de 60 mm de diámetro y un ángulo de 1°, en un intervalo de velocidad de deformación ($\dot{\gamma}$) de 10 – 1 500 s⁻¹, y

utilizando 1 mL de muestra a 22 °C, la cual se colocó directamente sobre la plataforma del reómetro sin ningún tipo de tratamiento previo.

La viscosidad aparente se determinó empleando la ley de potencia y se reportó a una velocidad de deformación de 300 s⁻¹, debido a que esta es la velocidad de deformación predominante dentro de un matraz agitado (Wilming *et al.*, 2013).

$$\eta = k\dot{\gamma}^m$$

Donde η es la viscosidad aparente (en Pa s), $\dot{\gamma}$ es la velocidad de deformación (en s⁻¹), k es el índice de consistencia (en Pa s) y m es el índice de flujo (adimensional).

7.6.8 Determinación de la capacidad viscosificante

La capacidad viscosificante del caldo de cultivo se determinó como la pendiente de una recta del logaritmo natural de la viscosidad generada ($\dot{\gamma} = 300 \text{ s}^{-1}$; 22 °C) en función de la concentración de alginato, de acuerdo a la relación reportada por Peña *et al.* (2011) y que ha sido empleada para concentraciones de alginato de hasta 6 g/L (Gómez-Pazarín *et al.*, 2015)

La ecuación resultante del ajuste exponencial es la siguiente:

$$\eta_{300 \text{ s}^{-1}} = e^{CV \cdot [\text{alginato}]}$$

Donde $\eta_{300 \text{ s}^{-1}}$ es la viscosidad a una velocidad de deformación de 300 s⁻¹ (en mPa s), CV es la capacidad viscosificante (en mPa s L/g_{alginato}) y $[\text{alginato}]$ es la concentración de alginato (en g/L).

7.6.9 Determinación del contenido de PHB

El contenido de PHB en las células se determinó por conversión del PHB a ácido crotonico y posterior análisis por HPLC de acuerdo al método reportado por Gómez *et al.* (2020).

Se utilizó una columna Aminex 87H acoplada a un equipo de HPLC con un detector de arreglo de diodos (Waters 2996). Como fase móvil se utilizó H₂SO₄ 5 mM a una temperatura de 50 °C, con un flujo de 0.65 mL/min. El volumen de inyección de las muestras fue de 20 µL.

Como referencia del contenido de PHB, se montó una curva de calibración utilizando estándares de PHB comercial a las siguientes concentraciones: 0.0001, 0.0005, 0.001, 0.002, 0.004 0.006, 0.008 y 0.01 g/L.

La ecuación de la curva para la determinación de ácido crotonico fue:

$$\text{Ácido crotonico } \left(\frac{g}{L}\right) = \frac{\text{Area} - 70\,980.86}{155\,281\,606.81}$$

El procesamiento de las muestras se realizó de la siguiente manera:

1. Se pesaron 5 mg de biomasa seca y se colocaron en un tubo de 1.5 mL.
2. Se adicionó 1 mL de H₂SO₄ concentrado y se dejó reaccionar a 90 °C por 1 hora.
3. Una vez las muestras se enfriaron, se realizó una dilución 1:100 con agua desionizada.
4. El contenido de ácido crotonico se determinó por absorción de luz UV a una longitud de onda de 220 nm.

7.7 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de *t* de *student* con un nivel de confianza del 95 %, de acuerdo a lo descrito por Box *et al.* (1989).

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Los cultivos se desarrollaron en condiciones de limitación de oxígeno

Para evaluar el efecto de la VTO sobre la producción del alginato y sus características fisicoquímicas, se utilizaron tres diferentes rangos de VTO, los cuales se modificaron a través del cambio en la velocidad de agitación. Las velocidades de agitación utilizadas fueron 200, 370 y 500 rpm.

Cabe mencionar que aparte de la velocidad de transferencia de oxígeno, la velocidad de agitación también está relacionada con las características hidrodinámicas del caldo de cultivo y por lo tanto al estrés hidrodinámico al que podrían estar sometidas las células. Sin embargo, se ha observado que en cultivos en fermentador de *Escherichia coli* (Hewitt *et al.*, 1998) y *Corynebacterium glutamicum* (Chamsartra *et al.*, 2005) variaciones en la velocidad de agitación no dañan a las células ni provocan cambios en la respuesta fisiológica más allá de los esperados relacionados al crecimiento celular y a la formación del producto de interés. Se sugiere que esta falta de respuesta celular es debido a que el tamaño de *E. coli* y *C. glutamicum* (2 – 6 μm) es menor que la microescala de turbulencia de Kolmogoroff, la cual está asociada al efecto de la tensión mecánica a la que se someten las células y a la tasa de disipación de energía del sistema (Chamsartra *et al.*, 2005).

De acuerdo a lo anterior y a que el tamaño de *A. vinelandii* es de aproximadamente 2 μm , se espera que en el presente trabajo cualquier cambio observado en la respuesta celular se deba al efecto de la VTO y no a la tensión dinámica provocada por la agitación.

En la Figura 8.1a y 8.1b se muestran los perfiles de transferencia de oxígeno para las cepas AT9 y ATCC9046 para las tres condiciones de agitación evaluadas.

Para las tres condiciones, la VTO se incrementó rápidamente desde las primeras horas del cultivo como resultado de la alta tasa respiratoria de *A. vinelandii*, debido a su metabolismo aeróbico. Esta alta tasa respiratoria condujo a que las tres condiciones evaluadas se desarrollaran bajo limitación de oxígeno.

Para los cultivos desarrollados a 200 rpm con la cepa AT9, la limitación de oxígeno se evidenció por la presencia de una zona “plateau” desde el inicio del cultivo hasta las 36 horas con un valor

máximo alrededor de 3.6 mmol/L h, después de lo cual, la VTO disminuyó rápidamente a valores alrededor de 1 mmol/L h.

Por otro lado, en la condición desarrollada a 370 rpm, dicha limitación de oxígeno se presentó entre las 2 y 24 horas de cultivo con una VTO máxima de 6.8 mmol/L. A las 25 horas de cultivo, la VTO disminuyó rápidamente a valores alrededor de los 2 mmol/L h. Mientras que los cultivos desarrollados a 500 rpm mostraron un incremento en la VTO en las primeras 5 horas de cultivo con una limitación de oxígeno entre las 5 y las 12 horas, con una VTO máxima de 12.4 mmol/L h; posteriormente, la VTO disminuyó a valores alrededor de los 3 mmol/L h a las 16 horas de cultivo.

Respecto a los cultivos desarrollados con la cepa ATCC9046, la condición de 200 rpm mostró limitación por oxígeno desde las 3 horas y hasta las 24 horas de cultivo, con una VTO máxima de 3.2 mmol/L h. Los cultivos desarrollados a 370 rpm mostraron limitación por oxígeno entre las 5 y las 24 horas de cultivo con una VTO máxima de 6.7 mmol/L h. A las 25 horas la VTO cayó a valores entre los 2.5 y 3 mmol/L h. Para la condición desarrollada a 500 rpm, la VTO se incrementó a 8 mmol/L h a las 5 horas de cultivo. Sin embargo, mostró un segundo incremento a las 11 horas y alcanzando un valor máximo de 11.7 mmol/L h, después de lo cual, la VTO cayó rápidamente a valores alrededor de 4.5 mmol/L h, seguido de un incremento gradual a 7 mmol/L h para nuevamente mostrar una fuerte caída a 3.5 mmol/L h a las 24 horas de cultivo. Este comportamiento que se observó entre las 12 y las 24 horas de cultivo no se había observado anteriormente para esta cepa y posiblemente puede deberse a una interferencia causada por la humedad presente en el gas a la salida del reactor.

De aquí en adelante, cada condición de agitación evaluada se referirá de acuerdo a la VTO máxima que presentó. También, las condiciones de VTO de 3.6 y 3.2; de 6.8 y 6.7; y de 12.4 y 11.7 mmol/L h se referirán como baja, intermedia y alta transferencia de oxígeno, respectivamente para las cepas AT9 y ATCC9046.

Por otro lado, en las figuras 8.1c y 8.1d se muestran los perfiles de TOD de los cultivos desarrollados con las cepas AT9 y ATCC9046 para las tres condiciones de $VTO_{m\acute{a}x}$ evaluadas. Para ambas cepas, en los cultivos desarrollados a baja VTO, los valores de TOD cayeron a 0 % desde las 3 horas de cultivo y permanecieron en ese valor hasta el final del cultivo. Para los cultivos a una VTO intermedia, con ambas cepas, la TOD fue de 3.5 % a partir de las 4 horas del cultivo. Para la condición de mayor VTO, para ambas cepas, la TOD osciló entre el 3 y 4 %, desde las 6 horas de

cultivo. Dados los valores de TOD, es evidente que para las tres condiciones de $VTO_{m\acute{a}x}$ evaluadas, para ambas cepas, la tensión de oxígeno disuelto se encontró por debajo del valor de TOD crítico (TOD= 4 %), por lo que se confirma que los cultivos se desarrollaron en limitación de oxígeno, al menos a partir de las 4 horas de cultivo.

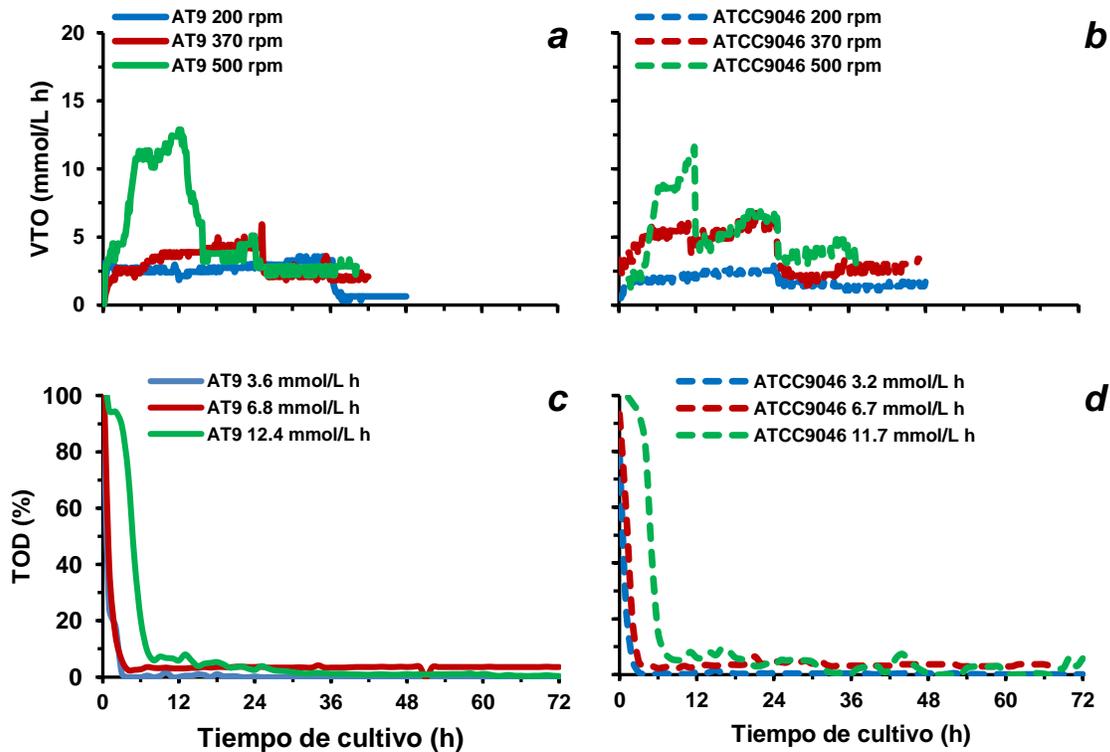


Figura 8.1. Velocidad de transferencia de oxígeno para los cultivos desarrollados bajo diferentes condiciones de agitación para la cepa AT9 (a) y la cepa ATCC90 (b) de *A. vinelandii*. Tensión de oxígeno disuelto para los cultivos con la cepa AT9 (c) y ATCC9046 (d) bajo diferentes condiciones de transferencia de oxígeno máxima.

8.2 El incremento en la $VTO_{m\acute{a}x}$ favoreció el crecimiento celular

En las figuras 8.2a y 8.2b se muestran las cinéticas de crecimiento celular con base en la acumulación de biomasa para las tres condiciones de $VTO_{m\acute{a}x}$ evaluadas para las cepas AT9 y ATCC9046, respectivamente. Para la cepa AT9, el cultivo con una $VTO_{m\acute{a}x}$ de 3.6 mmol/L h alcanzó una concentración de biomasa máxima de alrededor de 2.63 ± 0.08 g/L a las 36 horas de cultivo; mientras que para las condiciones de 6.8 y 12.4 mmol/L h, las mayores concentraciones se

alcanzaron a las 24 horas de cultivo y fueron de 3.71 ± 0.20 y 4.84 ± 0.22 g/L, respectivamente. Para el caso de los cultivos desarrollados con la cepa ATCC9046, los máximos valores de biomasa se alcanzaron a las 24 horas de cultivo. Para las condiciones de 3.2 y 6.7 mmol/L h, las concentraciones máximas fueron de 2.68 ± 0.22 y 3.46 ± 0.09 g/L, respectivamente; mientras que, para la condición de mayor transferencia, la máxima concentración fue de 4.89 ± 0.60 g/L. Para todos los cultivos, el momento en el que se alcanzaron las mayores concentraciones de biomasa, coinciden con el final de la fase de crecimiento exponencial y con el comienzo de la fase estacionaria, lo cual indica un cambio en el metabolismo celular y que es evidenciado por las rápidas caídas en los perfiles de VTO entre las 24 y 36 horas de cultivo (Figura 8.1)

Las concentraciones máximas de biomasa obtenidas en las condiciones de baja transferencia de oxígeno máxima para ambas cepas, son comparables a las concentraciones de 2.8 g/L reportadas por Díaz-Barrera *et al.* (2007) para valores de $VTO_{m\acute{a}x}$ similares en cultivos en biorreactor con la cepa ATCC9046. Para las tres condiciones de $VTO_{m\acute{a}x}$ evaluadas, la producción de biomasa máxima entre ambas cepas, no presentó diferencias significativas, lo que indica que el crecimiento celular medido como biomasa no se vio afectado por la ausencia de la actividad fosfodiesterasa de MucG y el incremento del segundo mensajero c-di-GMP solo afecta de forma local la actividad del complejo Alg8-Alg44.

En general, se observó que el incremento en la velocidad de transferencia de oxígeno máxima favoreció la acumulación de biomasa, lo cual se vio reflejado en un incremento en la velocidad específica de crecimiento (μ), (Tabla 8.1), ya que para las cepas AT9 y ATCC9046, en condiciones de baja transferencia de oxígeno máxima, las velocidades de crecimiento fueron de 0.08 ± 0.003 y 0.07 ± 0.003 h⁻¹, respectivamente. Mientras que, para la condición intermedia de transferencia de oxígeno máxima, las velocidades de crecimiento fueron de 0.12 ± 0.004 y 0.10 ± 0.002 h⁻¹, respectivamente. Finalmente, los valores de μ para los cultivos desarrollados en condiciones de alta transferencia de oxígeno máxima, fueron de 0.14 ± 0.005 y 0.12 ± 0.007 h⁻¹, para las cepas AT9 y ATCC9046, respectivamente.

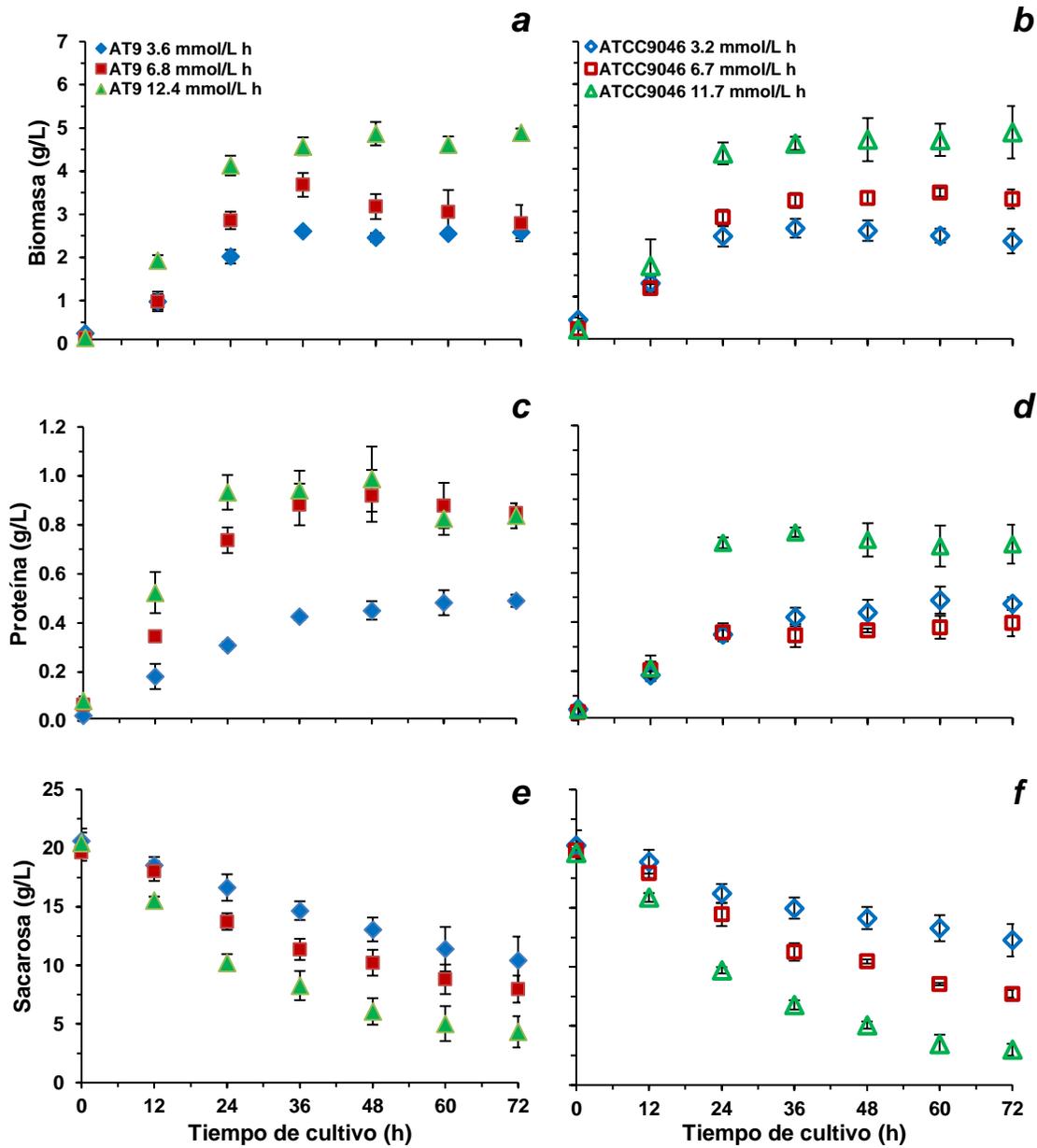


Figura 8.2. Crecimiento celular medido como *a* y *b*) biomasa, *c* y *d*) proteína y *e* y *f*) consumo de sacarosa de cultivos de *A. vinelandii* desarrollados a diferentes velocidades de transferencia de oxígeno máxima. *a*, *c* y *e* corresponden a la cepa AT9. *b*, *d* y *f* corresponden a la cepa ATCC9046.

Bajo condiciones de alta transferencia de oxígeno máxima, la bacteria muestra mayor crecimiento celular, respecto a las condiciones de menor transferencia de oxígeno máxima, donde el crecimiento celular fue menor. Esto es debido a que los principales precursores para el

crecimiento celular se sintetizan en la vía de las pentosas fosfato y en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y se ha observado que cuando *A. vinelandii* se cultiva en condiciones de baja transferencia de oxígeno máxima (2.4 mmol/L h), el flujo de carbono a través de la vía de las pentosas fosfato y a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos disminuye 4.8 y 27.6 veces, respectivamente, en comparación con el flujo de carbono que se presenta en condiciones de alta transferencia de oxígeno máxima (14.6 mmol/L h), (García *et al.*, 2018).

Tabla 8.1. Valores de producción máxima de biomasa, velocidad específica de crecimiento y rendimientos en la producción de biomasa con base al consumo de sacarosa para cada cepa bajo diferentes transferencias de oxígeno.

Cepa	VTO _{máx} (mmol/L h)	Biomasa _{máx} (g/L)	μ (h ⁻¹)	Rendimiento (g _{biomasa} /g _{sacarosa})
AT9	3.6 ^x	^a 2.62 ± 0.08	0.088 ± 0.003	^a 0.45 ± 0.03
	6.8 ^x	^b 3.71 ± 0.20	0.126 ± 0.004	^b 0.65 ± 0.16
	12.4 ^x	^c 4.84 ± 0.22	0.141 ± 0.005	^{a c} 0.48 ± 0.07
ATCC9046	3.2 ^x	^a 2.68 ± 0.22	0.070 ± 0.003	0.62 ± 0.02
	6.7 ^x	^b 3.46 ± 0.09	0.106 ± 0.002	^b 0.71 ± 0.08
	11.7 ^x	^c 4.89 ± 0.60	0.121 ± 0.007	^c 0.49 ± 0.06

En superíndice se indica el análisis estadístico. En cada columna, misma letra indica que no hay diferencia significativa.

^x no se comparó estadísticamente.

Adicionalmente, también se evaluó el contenido de proteína celular soluble (Figuras 8.2c y 8.2d). Para la condición de más baja transferencia de oxígeno máxima, las mayores concentraciones de proteína fueron estadísticamente iguales, con valores de 0.51 ± 0.01 y 0.50 ± 0.03 g/L para la AT9 y la ATCC9046. Mientras que, para la condición intermedia de transferencia, las concentraciones de proteína de 0.91 ± 0.05 y 0.38 ± 0.04 g/L, fueron significativamente diferentes y para la condición de mayor transferencia de oxígeno máxima, se alcanzaron concentraciones de 0.98 ± 0.11 y 0.78 ± 0.02 g/L, respectivamente para cada cepa, las cuales, también mostraron diferencias significativas.

De forma similar a la producción de biomasa, el incremento en la VTO_{máx} favoreció la producción de proteína, lo cual también se vio reflejado en las velocidades específicas de crecimiento (Tabla

8.2), ya que para las condiciones de transferencia de oxígeno máxima de 3.6, 6.8 y 12.4 mmol/L h con la cepa AT9, los valores de μ fueron de 0.09 ± 0.002 , 0.10 ± 0.001 y 0.11 ± 0.004 h⁻¹. De forma similar, con la cepa ATCC9046, las velocidades de crecimiento fueron de 0.08 ± 0.005 , 0.10 ± 0.002 y 0.12 ± 0.004 h⁻¹ para VTOs de 3.2, 6.7 y 11.7 mmol/L h, respectivamente.

Tabla 8.2. Valores de producción máxima de proteína, velocidad específica de crecimiento y rendimientos en la producción de proteína con base al consumo de sacarosa para cada cepa bajo diferentes transferencias de oxígeno.

Cepa	VTO _{máx} (mmol/L h)	Proteína _{máx} (g/L)	μ (h ⁻¹)	Rendimiento (g _{proteína} /q _{sacarosa})
AT9	3.6 ^x	^c 0.50 ± 0.01	0.092 ± 0.002	^{a c} 0.086 ± 0.003
	6.8 ^x	^a 0.91 ± 0.05	^a 0.100 ± 0.001	0.160 ± 0.033
	12.4 ^x	^a 0.98 ± 0.11	0.110 ± 0.004	^{a d} 0.098 ± 0.016
ATCC9046	3.2 ^x	^c 0.50 ± 0.03	0.085 ± 0.005	^{b c} 0.093 ± 0.007
	6.7 ^x	0.38 ± 0.04	^a 0.099 ± 0.002	^b 0.073 ± 0.013
	11.7 ^x	0.78 ± 0.02	0.117 ± 0.004	^{b d} 0.079 ± 0.001

En superíndice se indica el análisis estadístico. En cada columna, misma letra indica que no hay diferencia significativa.

^x no se comparó estadísticamente.

En las figuras 8.2e y 8.2f se muestra el consumo de sacarosa a través del tiempo y se observa que el consumo aumentó al incrementarse la transferencia de oxígeno máxima. Sin embargo, para ninguna condición de VTO se agotó la fuente de carbono, siendo las concentraciones de sacarosa al final del cultivo de 10.43 ± 2.01 , 7.98 ± 1.15 y 4.33 ± 1.33 g/L para 3.6, 6.8 y 12.4 mmol/L h con la cepa AT9, respectivamente, y de 12.25 ± 1.36 , 7.72 ± 0.42 y 2.99 ± 0.50 g/L, para las condiciones de VTO_{máx} de 3.2, 6.7 y 11.7 mmol/L h con la cepa ATCC9046. Para todos los cultivos, las concentraciones finales de sacarosa se encontraron por encima del valor de la constante de afinidad de la sacarosa (K_s) de 0.1 g/L, reportada por Diaz-Barrea *et al.* (2018). Concentraciones de sacarosa por encima de K_s , sugieren que los cultivos no se encontraron limitados por la fuente de carbono.

Los rendimientos de biomasa con respecto al consumo de sacarosa para la cepa AT9 fueron de 0.45 ± 0.03 , 0.65 ± 0.16 y 0.48 ± 0.07 g_{biomasa}/g_{sacarosa} para 3.6, 6.8 y 12.4 mmol/L h,

respectivamente. Mientras que para la cepa ATCC9046 los rendimientos para las condiciones de $VTO_{m\acute{a}x}$ de 3.2, 6.7 y 11.7 mmol/L h fueron de 0.62 ± 0.02 , 0.71 ± 0.08 y 0.49 ± 0.06 $g_{biomasa}/g_{sacarosa}$, respectivamente (Tabla 8.1).

Por su parte, los rendimientos de proteína con respecto a la sacarosa para la cepa AT9 fueron de 0.08 ± 0.003 , 0.16 ± 0.033 y 0.10 ± 0.016 $g_{prote\acute{i}na}/g_{sacarosa}$ para 3.6, 6.8 y 12.4 mmol/L h, respectivamente. Mientras que para la cepa ATCC9046 los rendimientos para las condiciones de $VTO_{m\acute{a}x}$ de 3.2, 6.7 y 11.7 mmol/L h fueron de 0.09 ± 0.007 , 0.07 ± 0.013 y 0.08 ± 0.001 $g_{prote\acute{i}na}/g_{sacarosa}$, respectivamente (Tabla 8.1).

Los rendimientos de producción de biomasa y proteína con base en el consumo de sustrato para la cepa AT9, muestran que al incrementarse la $VTO_{m\acute{a}x}$ de 3.6 a 6.8 mmol/L h, la bacteria aprovecha la fuente de carbono para el crecimiento celular. Sin embargo, al incrementarse la $VTO_{m\acute{a}x}$ a 12.4 mmol/L h, el rendimiento disminuye y es estadísticamente igual al rendimiento obtenido a una $VTO_{m\acute{a}x}$ de 3.6 mmol/L h. Lo anterior, puede deberse a que una mayor $VTO_{m\acute{a}x}$ favorece un mayor consumo de la fuente de carbono, la cual no es dirigida completamente hacia el crecimiento celular, sino que es posible que se utilice para el mantenimiento celular y la síntesis de algunos otros compuestos, como lo es la producción de alginato y PHB.

Para el caso de la cepa ATCC9046, los rendimientos de biomasa respecto al consumo de sacarosa fueron estadísticamente iguales a los de la cepa AT9 (excepto para las condiciones de menor VTO), derivado de la similitud entre los perfiles de consumo de sustrato y de producción de biomasa. Por el contrario, para la producción de proteína, los rendimientos se encontraron alrededor de 0.08 $g_{prote\acute{i}na}/g_{sacarosa}$ (Tabla 8.1) y no se vieron afectados por el incremento en la $VTO_{m\acute{a}x}$, lo cual contrasta con lo observado para la cepa AT9 y para la misma cepa ATCC9046 cultivada en condiciones de transferencia de oxígeno máxima similares.

8.3 Contenido de PHB no se vio afectado por la $VTO_{m\acute{a}x}$

En la figura 8.3 se muestra la producción de PHB en los cultivos con las cepas AT9 (Figura 8.3a) y ATCC9046 (Figura 8.3b). Para ambas cepas y para todas las condiciones de $VTO_{m\acute{a}x}$, la producción de PHB estuvo ligada a la fase de crecimiento exponencial y disminuyó durante la fase

estacionaria. Para las tres condiciones de $VTO_{m\acute{a}x}$ con ambas cepas la máxima acumulación de PHB se presentó a las 24 horas de cultivo y disminuyó a alrededor del 47 % a las 72 horas.

Para las condiciones de $VTO_{m\acute{a}x}$ de 3.6, 6.8 y 12.4 mmol/L h con la cepa AT9, la acumulación máxima de PHB fue de 87 ± 6.3 , 71 ± 4.2 y 80 ± 7.4 %, respectivamente. Para la cepa ATCC9046, para las mismas condiciones, las máximas acumulaciones fueron de 64 ± 3.6 , 72 ± 3.8 y 78 ± 5.0 %.

Es bien sabido que, cuando *A. vinelandii* ATCC9046 es cultivada en condiciones de limitación de oxígeno, el contenido de PHB tiende a aumentar, por lo que en las condiciones de menor transferencia de oxígeno máxima (3.6 y 3.2 mmol/L h), el contenido de PHB debería ser mayor, respecto a las condiciones de mayor VTO (12.4 y 11.7 mmol/L h). Sin embargo, no se observa una relación clara entre la producción de PHB y la disponibilidad de oxígeno y las principales diferencias en la producción de PHB durante la fase de crecimiento entre ambas cepas, podría deberse al contenido inicial de PHB, ya que un menor contenido inicial de PHB, conduce a una mayor acumulación de este (Millan *et al.*, 2017).

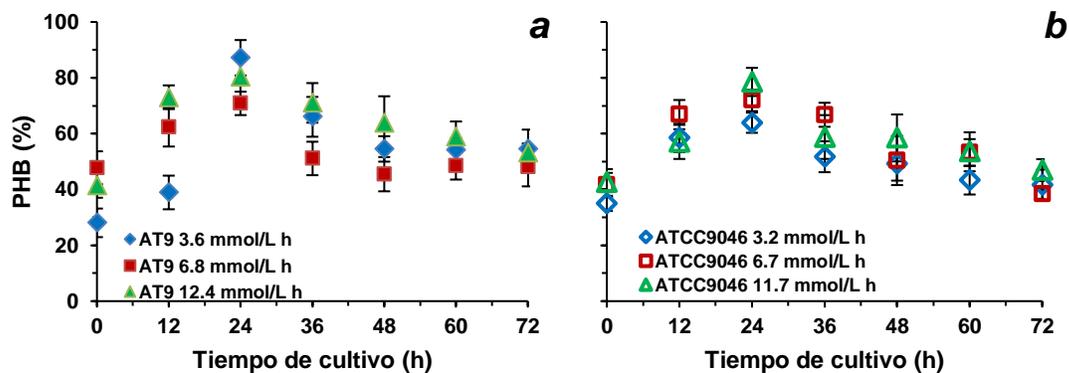


Figura 8.3. Contenido de PHB en cultivos de *A. vinelandii* AT9 (a) y ATCC9046 (b) desarrollados a diferentes velocidades de transferencia de oxígeno máxima.

Como ya se mencionó, la producción de PHB se favorece en condiciones de limitación nutricional. Sin embargo, en el presente trabajo, la producción de PHB no se vio favorecida en ninguno de los cultivos realizados, por lo que cabría esperar que en ningún caso los cultivos se encontraron bajo estrés nutricional y el comportamiento observado podría deberse a otros factores como la composición del medio o la evolución del pH del caldo. Es importante señalar que a diferencia de

la mayoría de los trabajos reportados en la literatura, en donde se utilizan sales de amonio como fuente de nitrógeno o se utilizan condiciones de diazotrofia y/o se mantiene el pH constante, en el presente trabajo se utilizó extracto de levadura como fuente de nitrógeno y no se controló el pH.

Dado que el pH del medio disminuyó al incrementarse la VTO y también disminuyó a través del tiempo de cultivo (Sección 8.7, Figura 8.13), cabría esperar que estos cambios en el pH pudieran afectar la actividad de las enzimas involucradas en la síntesis y degradación del PHB.

8.4 El incremento en la $VTO_{m\acute{a}x}$ no afectó la producción de alginato para la cepa AT9

Los perfiles de producción de alginato se muestran en las Figuras 8.4a y 8.4b. Para todas las condiciones con las dos cepas, la mayor producción de alginato se presentó durante la fase de crecimiento exponencial hasta las 24 y 36 horas de cultivo y fue a partir de este momento en que se alcanzaron las mayores producciones de alginato y se mantuvieron constantes durante el resto del cultivo.

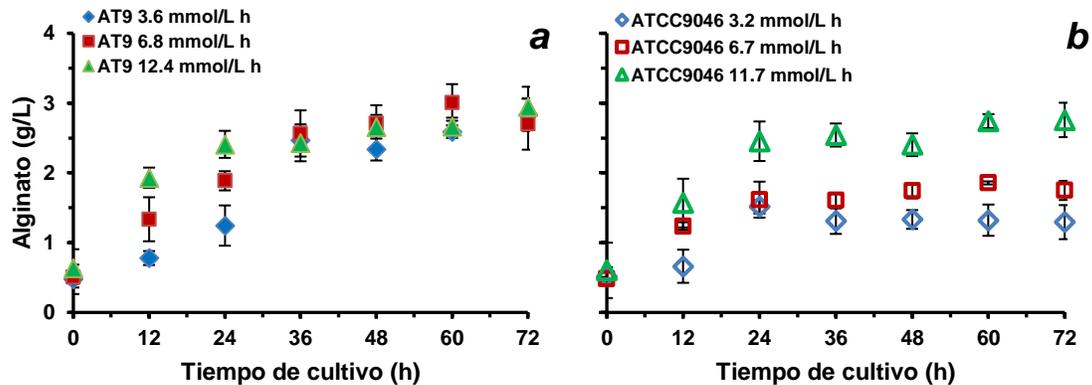


Figura 8.4. Perfiles de producción de alginato en cultivos de las cepas AT9 (a) y ATCC9046 (b) de *Azotobacter vinelandii* desarrollados a diferentes velocidades de transferencia de oxígeno máxima.

Para los cultivos con la cepa AT9, las máximas producciones de alginato no mostraron diferencias significativas, por lo que la $VTO_{m\acute{a}x}$ no afectó la producción de alginato, la cual se encontró alrededor de 2.92 ± 0.09 g/L (ver Tabla 8.3). Sin embargo, como se puede ver en las primeras 24

horas de cultivo, el incremento en la $VTO_{m\acute{a}x}$ sí favoreció la velocidad de acumulación del alginato. Ahumada-Manuel *et al.* (2017) reportaron un comportamiento similar para la cepa GG9 cultivada en matraces agitados bajo diferentes velocidades de transferencia de oxígeno máxima, en un rango de 1 – 5.2 mmol/L h. En dicho trabajo, la producción de alginato no se vio afectada por la $VTO_{m\acute{a}x}$ del sistema. La relación observada en el presente trabajo entre la producción de alginato y la $VTO_{m\acute{a}x}$ (Figura 8.5), respaldan la idea de que la proteína mucG controla la actividad del complejo alginato-polimerasa en función de la disponibilidad de oxígeno, por lo que en ausencia de la proteína MucG, la bacteria no es capaz de sensor la disponibilidad de oxígeno presente en el medio y por lo tanto la cantidad de alginato producido es igual, independientemente de la $VTO_{m\acute{a}x}$ del sistema.

Respecto a los rendimientos en la producción de alginato en función del consumo de sacarosa para la cepa AT9, los valores fueron de 0.41 ± 0.10 , 0.31 ± 0.04 y 0.29 ± 0.06 $g_{alginato}/g_{sacarosa}$, para los valores de $VTO_{m\acute{a}x}$ de 3.6, 6.7 y 12.4 mmol/L h, respectivamente. Estadísticamente no se encontraron diferencias, por lo que la $VTO_{m\acute{a}x}$ tampoco influyó en el rendimiento de la producción del alginato respecto a al consumo de sacarosa.

Tabla 8.3. Valores máximos de producción de alginato y rendimientos con base al consumo de sacarosa para cada cepa bajo diferentes velocidades de transferencia de oxígeno.

Cepa	$VTO_{m\acute{a}x}$ (mmol/L h)	Alginato _{máx} (g/L)	Rendimiento ($g_{alginato}/g_{sacarosa}$)
AT9	3.6 ^x	^a 2.83 ± 0.23	^a 0.41 ± 0.10
	6.8 ^x	^a 3.00 ± 0.26	^a 0.31 ± 0.04
	12.4 ^x	^{a b} 2.94 ± 0.28	^a 0.29 ± 0.06
ATCC9046	3.2 ^x	1.51 ± 0.09	^a 0.34 ± 0.02
	6.7 ^x	1.85 ± 0.02	^a 0.35 ± 0.007
	11.7 ^x	^b 2.75 ± 0.24	^a 0.29 ± 0.06

En superíndice se indica el análisis estadístico. En cada columna, misma letra indica que no hay diferencia significativa.

^x no se comparó estadísticamente.

Para los cultivos con la cepa ATCC9046, el incremento en la $VTO_{\text{máx}}$ condujo a un aumento en la producción de alginato (Figura 8.5), pues para las transferencias de oxígeno máximas de 3.2, 6.7 y 11.7 mmol/L h, las concentraciones de alginato fueron de 1.51 ± 0.09 , 1.85 ± 0.02 y 2.75 ± 0.24 g/L, respectivamente. Los rendimientos para dichas condiciones de $VTO_{\text{máx}}$ fueron de 0.34 ± 0.02 , 0.35 ± 0.04 y 0.29 ± 0.007 g_{alginato}/g_{sacarosa}, respectivamente, las cuales no fueron estadísticamente diferentes.

Dado que, para ambas cepas, la $VTO_{\text{máx}}$ no influyó en el rendimiento del alginato respecto al consumo de sacarosa, esta tendencia sugiere que la fuente de carbono se está dirigiendo hacia la producción de algún otro metabolito, posiblemente hacia la producción de PHB.

Este efecto positivo del incremento de la $VTO_{\text{máx}}$ sobre la producción de alginato con la cepa ATCC9046 ya había sido documentado previamente por Díaz-Barrera *et al.* (2007) y Peña *et al.* (2011) para cultivos de *A. vinelandii* ATCC9046 en biorreactor y en matraces agitados, respectivamente.

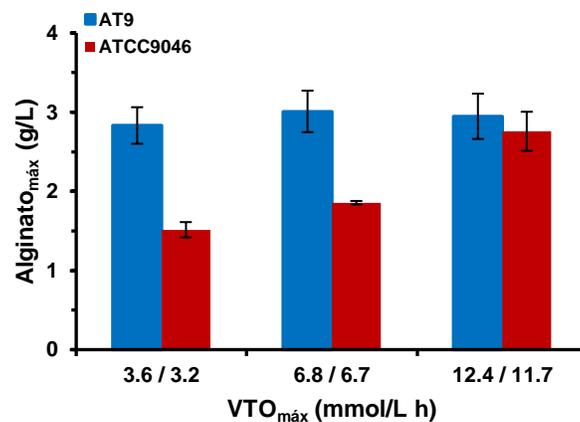


Figura 8.5. Efecto de la velocidad de transferencia de oxígeno máxima sobre la producción máxima de alginato en cultivos con la cepa AT9 (barras azules) y la cepa ATCC9046 (barras rojas) de *A. vinelandii*.

Las producciones de alginato con la cepa AT9, se encuentran por debajo de los 3.8 g/L de alginato producidos por la misma cepa cultivada en matraces agitados en condiciones de $VTO_{\text{máx}}$ de 5.2 mmol/L h (García *et al.*, 2020). De forma similar, la producción de alginato con la cepa ATCC9046, contrasta con los 3.7 g/L de alginato reportado por Gómez-Pazarín (2015) para cultivos con la

misma cepa en reactores de 3 L. Sin embargo, en dicho trabajo no se evaluó la velocidad de transferencia de oxígeno máxima en la que se desarrollaron los cultivos y además, la velocidad de agitación varió entre 320 y 500 rpm.

Un aspecto importante a considerar, es que, a diferencia de los trabajos antes citados, en el presente trabajo, la producción de alginato se determinó espectrofotométricamente por el método de carbazol (sección 7.6.4). Lo anterior, debido a que, al realizarse gravimétricamente, se observó la presencia de cristales, posiblemente derivados de las sales empleadas para la separación del alginato y de las sales presentes en el medio de cultivo. Dichas sales pueden interferir con las cantidades finales de producto, ya que, al determinar el contenido de ácidos urónicos en las muestras procesadas por gravimetría, se observó que entre el 60 y el 80 % de la cantidad de producto pesado, correspondía a ácidos urónicos. Por lo anterior, se optó por determinar la producción de alginato de acuerdo a la cantidad de ácidos urónicos presentes en el precipitado y sin utilizar las soluciones de NaCl y Na₂EDTA empleadas para la separación del alginato.

8.5 El alginato de mayor peso molecular se presentó en condiciones de menor VTO_{máx}

En la figura 8.6 se muestra la evolución de el peso molecular promedio del alginato producido en los cultivos con las cepas AT9 (Figura 8.6a) y ATCC9046 (Figura 8.6b). Para la cepa AT9, el mayor peso molecular promedio fue de $2\,927 \pm 260$ kDa y se presentó en la condición de más baja transferencia de oxígeno máxima (3.6 mmol/L h) a las 24 horas de cultivo. Después de ese tiempo, disminuyó a 908 ± 442 kDa al final del cultivo. Mientras que, para las condiciones de VTO_{máx} de 6.8 y 12.4 mmol/L h, los mayores pesos moleculares promedio fueron de $2\,077 \pm 329$ y $1\,501 \pm 392$ kDa entre las 36 y las 48 horas de cultivo, respectivamente. De forma similar, con la cepa ATCC9046, en condiciones de baja transferencia de oxígeno máxima fue en donde se presentó el mayor peso molecular promedio de $2\,315 \pm 185$ kDa entre las 24 y las 36 horas de cultivo, posteriormente, disminuyó a valores de $1\,205 \pm 115$ kDa al final del cultivo. Por su parte, para las condiciones de VTO_{máx} de 6.7 y 11.7 mmol/L h, los pesos moleculares fueron de $1\,560 \pm 170$ y $1\,655 \pm 40$ kDa a partir de las 24 horas de cultivo y se mantuvo constante durante el resto del cultivo.

Con la cepa AT9, en condiciones de baja transferencia de oxígeno máxima (3.6 mmol/L h), es posible obtener alginatos con un peso molecular promedio cercano a los 3 000 kDa (2 927 kDa). Estos pesos moleculares son comparables a los 3 100 kDa reportados por García *et al.* (2020) con la misma cepa (AT9) cultivada en matraces agitados y a una $VTO_{m\acute{a}x}$ de 5.2 mmol/L h.

Es importante recordar que con la cepa parental (ATCC9046) los máximos pesos moleculares se han obtenido en una región de $VTO_{m\acute{a}x}$ por debajo de los 5 mmol/L h (Reyes-Barrera *et al.*, 2003; Gómez-Pazarín *et al.*, 2015) y dado el potencial de la cepa AT9 para producir alginato con pesos moleculares de 3 100 kDa para una $VTO_{m\acute{a}x}$ de 5.2 mmol/L h, se esperaba que al cultivar a la cepa AT9 en una región de transferencia de oxígeno máxima por debajo de dicho valor, la cepa AT9 sería capaz de producir alginato con pesos moleculares por encima de los 3 100 kDa. Aunque el alginato producido en el presente trabajo no superó dicho valor, los máximos pesos moleculares alcanzados fueron de 2 927 kDa, un valor cercano al obtenido en matraces agitados.

El hecho de que no se haya observado el comportamiento esperado, posiblemente se deba a que el máximo peso molecular del alginato que puede producir la bacteria es de alrededor de 3 000 kDa y aunque se utilicen condiciones de transferencia de oxígeno máxima aun menores, el peso molecular no superará dicho valor.

Sin embargo, lo anterior, confirma el potencial de la cepa AT9 para producir alginato con un alto peso molecular (~ 3 000 kDa).

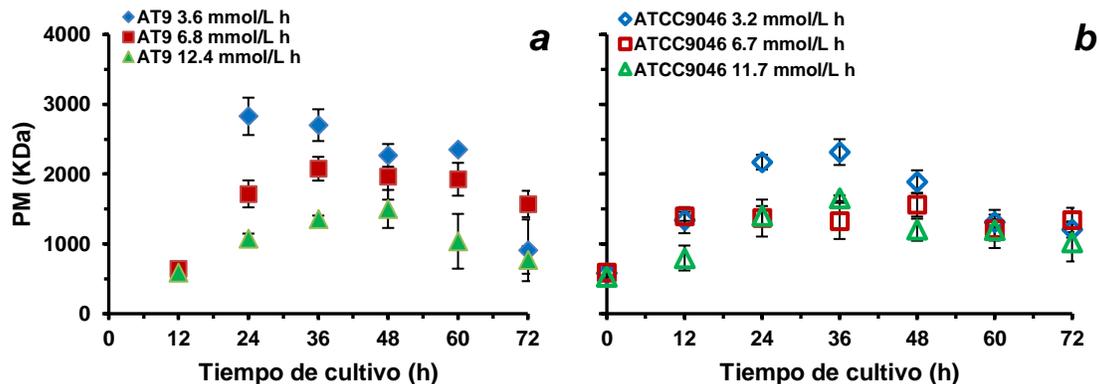


Figura 8.6. Peso molecular promedio del alginato producido en cultivos de *A. vinelandii* AT9 (a) y ATCC9046 (b) desarrollados a diferentes velocidades de transferencia de oxígeno máxima.

La disminución en el peso molecular del alginato a través del tiempo podría deberse a la actividad alginato liasa, ya que en ausencia de dicha actividad, *A. vinelandii* es capaz de sintetizar alginato de peso molecular uniforme y de baja dispersión durante el desarrollo del cultivo. Sin embargo, cuando la alginato liasa está presente, se observa que la enzima alcanza su actividad máxima durante la fase de crecimiento estacionario y hay una caída en el peso molecular del alginato (Trujillo-Roldán *et al.*, 2004).

Al evaluar el peso molecular del alginato en función de la velocidad de transferencia de oxígeno máxima, es posible observar una relación inversa entre ambos parámetros (Figura 8.7). Este comportamiento concuerda con lo observado para la cepa GG9, que posee la misma mutación que la cepa AT9 (Ramos D., 2019) y para la cepa ATCC9046, con la cual, en condiciones de baja transferencia de oxígeno máxima, se favorece la producción de alginato de mayor peso molecular (Díaz-Barrera *et al.*, 2007). Sin embargo, a pesar de presentar el mismo comportamiento, con la cepa AT9 es posible obtener alginato de mayor peso molecular, respecto al alginato obtenido con las cepas GG9 y ATCC9046.

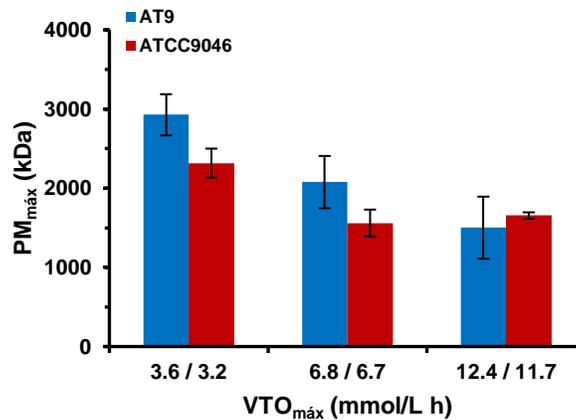


Figura 8.7. Efecto de la velocidad de transferencia de oxígeno máxima sobre el peso molecular promedio máximo de alginato en cultivos con la cepa AT9 (barras azules) y la cepa ATCC9046 (barras rojas) de *A. vinelandii*.

Ahumada-Manuel *et al.* (2017), reportaron que en cultivos en matraces agitados con la cepa GG9 bajo diferentes condiciones de transferencia de oxígeno máxima (1 y 5.2 mmol/L h) no se observaron diferencias en el peso molecular. Estos autores propusieron que MucG era la

responsable de controlar la producción y el peso molecular del alginato en función de la disponibilidad de oxígeno, debido a que dicha proteína posee un dominio PAS (Ahumada-Manuel *et al.*, 2020) que permite sentir la disponibilidad de oxígeno (Hengge *et al.*, 2019).

Por lo anterior, dichos autores propusieron que en ausencia de dicha proteína y por lo tanto en ausencia de dicho dominio sensible al oxígeno, la bacteria no sería capaz de sentir los cambios en la disponibilidad de oxígeno, lo que conduciría a la síntesis de alginato con pesos moleculares similares, independientemente de la transferencia de oxígeno máxima (contrario a lo observado en el presente trabajo).

Ahumada-Manuel *et al.* (2020) propusieron que en *A. vinelandii*, la diguanilato ciclasa AvGReg, una proteína con un dominio sensor acoplado a globina que une directamente oxígeno, es la principal fuente de c-di-GMP para la producción de alginato. También, estos autores observaron que en condiciones de menor transferencia de oxígeno máxima (1 - 2.5 mmol/L h) los niveles de c-di-GMP fueron el doble respecto a los determinados en condiciones de mayor transferencia de oxígeno máxima (5.2 mmol/L h). Por lo que, la actividad del complejo alginato polimerasa Alg8-Alg44 está regulada por los niveles de c-di-GMP.

La cantidad de este segundo mensajero, a su vez, está regulada por la actividad de la fosfodiesterasa MucG y por la diguanilato-ciclasa AvGReg, en función de la disponibilidad de oxígeno (Ahumada-Manuel *et al.*, 2017; Ahumada-Manuel *et al.*, 2020).

Por lo anterior y dado que con la cepa AT9 se presentaron diferencias en el peso molecular del alginato en función de la velocidad de transferencia de oxígeno máxima (Figura 8.7), cabría decir que, la ausencia de la actividad fosfodiesterasa de MucG, permite mantener los altos niveles de c-di-GMP generados por la actividad de AvGReg en respuesta a una baja disponibilidad de oxígeno.

Adicionalmente se determinó el índice de polidispersión (IP) del alginato para evaluar su homogeneidad a través del tiempo de cultivo (Figura 8.8). Para ambas cepas y para las tres condiciones de $VTO_{m\acute{a}x}$ evaluadas, la evolución de la polidispersión del alginato fue similar. Durante la primera mitad del cultivo, los valores del IP aumentaron linealmente de 1 hasta un valor máximo alrededor de 4.1 ± 0.33 para la cepa AT9 y 4.8 ± 0.59 para la cepa ATCC9046. Posteriormente, el índice de polidispersión disminuyó a valores alrededor de 2.5 ± 0.46 para ambas cepas.

Para ambas cepas, la heterogeneidad del alginato aumentó hasta las 36 horas de cultivo, momento en que también se presentaron los máximos pesos moleculares (Figura 8.6). Después de ese momento, el tamaño del alginato producido comenzó a ser más homogéneo. Dado que a partir de las 24 - 36 horas, la concentración de alginato fue constante para todos los cultivos (Figura 8.4) y que el peso molecular disminuyó o fue constante (Figura 8.6), entonces, el aumento en la homogeneidad del alginato hacia el final del cultivo, podría deberse a la acción de las diferentes alginato liasas, generando cadenas de alginato de tamaño más uniforme al final del cultivo.

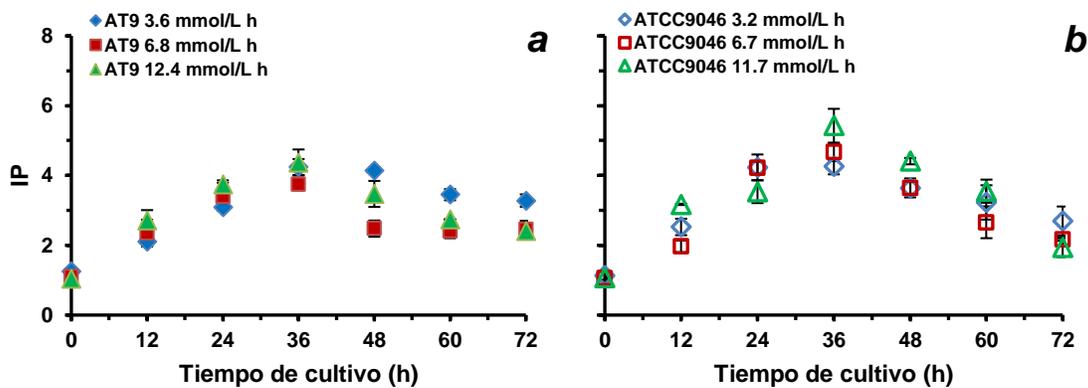


Figura 8.8. Índice de polidispersión del alginato producido en cultivos de *A. vinelandii* AT9 (a) y ATCC9046 (b) desarrollados a diferentes velocidades de transferencia de oxígeno máxima.

También se observó que para la cepa ATCC9046, los valores de IP fueron estadísticamente mayores a los obtenidos con la cepa AT9, excepto para las condiciones de menor $VTO_{máx}$ (3.6 y 3.2 mmol/L h). Éste mayor grado de homogeneidad del alginato producido por la cepa AT9, podría interpretarse como un alginato de mejor calidad, respecto al alginato producido por la cepa ATCC9046.

Además, a diferencia de la cepa ATCC9046, con la cual, el incremento en la $VTO_{máx}$ condujo a un incremento en el IP, la cepa AT9 no presentó diferencias estadísticas entre los valores de IP del alginato con los máximos pesos moleculares para las diferentes transferencias de oxígeno evaluadas, por lo que, la disponibilidad de oxígeno no influyó en la heterogeneidad del alginato producido por dicha cepa. Lo anterior podría estar relacionado a la falta de regulación del

complejo alginato polimerasa Alg8-Alg44 por parte de la proteína MucG en respuesta a la disponibilidad de oxígeno.

8. 6 El incremento en la $VTO_{m\acute{a}x}$ favoreció la acetilación del alginato

En la figura 8.9 se muestra el grado de acetilación del alginato producido por la cepa AT9 (Figura 8.9a) y por la cepa ATCC9046 (Figura 8.9b). Para la condición de menor transferencia de oxígeno máxima (3.6 mmol/L h) en los cultivos con la cepa AT9, el grado de acetilación del alginato se mantuvo por debajo del 1.0 % durante todo el cultivo y se incrementó ligeramente del 0.2 ± 0.03 al 0.6 ± 0.08 % durante el desarrollo del cultivo. Para la condición de $VTO_{m\acute{a}x}$ de 6.8 mmol/L h, el grado de acetilación se encontró alrededor del 1.0 % de las 24 a las 72 horas. En los cultivos en los que la $VTO_{m\acute{a}x}$ fue de 12.4 mmol/L h, el alginato que se aisló exhibe un grado de acetilación del 3.0 ± 0.41 % a las 24 horas y posteriormente disminuyó a valores cercanos al 2.0 %.

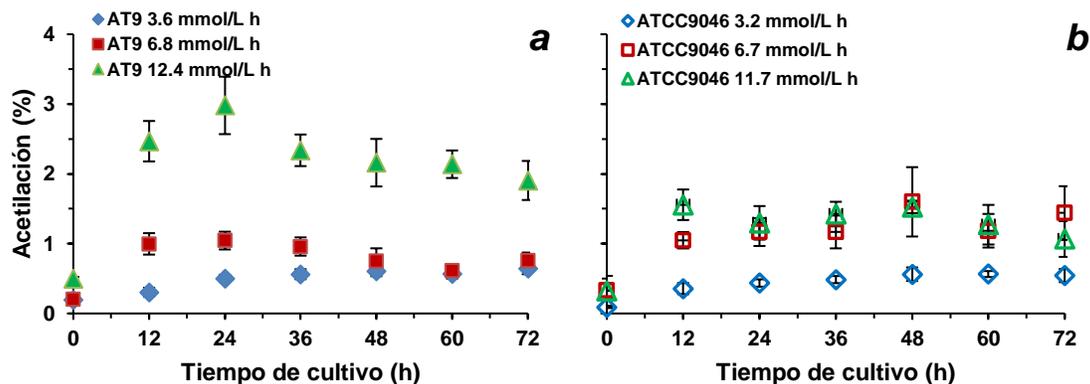


Figura 8.9. Grado de acetilación del alginato producido en cultivos de *A. vinelandii* AT9 (a) y ATCC9046 (b) desarrollados a diferentes velocidades de transferencia de oxígeno máxima.

Para los cultivos con la cepa ATCC9046 a una $VTO_{m\acute{a}x}$ de 3.2 mmol/L h, el porcentaje de acetilación en el alginato se incrementó ligeramente durante el cultivo; sin embargo no excedió el 0.6 % de acetilación. Para las condiciones de 6.7 y 11.7 mmol/L h, el porcentaje de acetilación se encontró alrededor del 1.5 % a partir de las 12 horas de cultivo. Al evaluar el efecto de la $VTO_{m\acute{a}x}$ sobre la acetilación, se puede observar que al incrementar la $VTO_{m\acute{a}x}$ de 3.2 a 6.7 mmol/L h, el grado de

acetilación en el polímero aumentó de 0.6 a 1.6 % y para valores de $VTO_{m\acute{a}x}$ más altos (11.7 mmol/L h) la acetilación no se vio afectada, por lo que a partir de los 6.7 mmol/L h, la acetilación es independiente de la $VTO_{m\acute{a}x}$.

Para la cepa AT9, es evidente que el incremento en la $VTO_{m\acute{a}x}$ favoreció la acetilación del alginato y fue en la condición de mayor transferencia de oxígeno máxima en donde se pudo observar el mayor porcentaje de acetilación. Para la cepa ATCC9046, los máximos porcentajes de acetilación se alcanzaron a partir de los 6.7 mmol/L h. Este efecto de la $VTO_{m\acute{a}x}$ sobre el grado de acetilación concuerda con lo observado para *A. vinelandii* ATCC9046 cultivada bajo diferentes condiciones de cultivo (limitación de sustrato, diazotrofia, control de pH) en donde el incremento en la disponibilidad de oxígeno favorece la acetilación del alginato (Peña *et al.*, 2006; Castillo *et al.*, 2013 a y b). Lo anterior puede deberse a que el incremento en la disponibilidad de oxígeno conduce a una mayor actividad del ciclo de los ácidos tricarbóxicos, en donde se produce una mayor cantidad de Acetil-CoA, el cual, eventualmente puede ser utilizado para la acetilación del alginato.

Es evidente que con la cepa AT9, el grado de acetilación del alginato fue casi 2 veces mayor al grado de acetilación del alginato producido por la cepa ATCC9046, lo cual, tal vez se encuentre relacionado a la ausencia de la proteína MucG en la cepa AT9. Quizas, el incremento en los niveles de c-di-GMP influyen de alguna manera en la actividad de las proteínas AlgI, AlgJ, AlgF y AlgX, las cuales se encuentran implicadas en la acetilación del alginato (Chanasit *et al.* 2020).

No obstante, para ambas cepas, el grado de acetilación se encontró por debajo del 2 %, lo cual, se encuentra por debajo del rango de acetilación (4 – 5.8 %) previamente reportado para cultivos de *A. vinelandii* ATCC9046 desarrollados en condiciones de limitación de oxígeno. Estos bajos valores en los porcentajes de acetilación pueden deberse al nivel de TOD (~ 0 %) en el que se desarrollaron los cultivos, ya que se ha observado que el incremento en la TOD conduce a un mayor grado de acetilación (Castillo *et al.*, 2013b; Díaz-Barrera *et al.*, 2017).

8.7 Las mayores viscosidades y capacidades viscosificantes se obtuvieron en condiciones de mayor $VTO_{m\acute{a}x}$

En las Figura 8.10 se muestran los perfiles de viscosidad de los cultivos bajo las diferentes condiciones de transferencia de oxígeno máxima evaluadas. Los perfiles de viscosidad fueron similares para ambas cepas.

Para los cultivos a baja transferencia de oxígeno máxima (3.6 y 3.2 mmol/L h) la viscosidad del caldo aumentó ligeramente de 1.3 a 4.6 ± 0.2 y 5.3 ± 1.2 mPa s, para las cepas AT9 y ATCC9046, respectivamente. De forma similar, para los cultivos a una $VTO_{m\acute{a}x}$ intermedia, la viscosidad del caldo al final del cultivo fue de 10.1 ± 0.7 y 10.8 ± 0.7 mPa s. Y para los cultivos a alta transferencia de oxígeno máxima, las viscosidades finales fueron de 25.7 ± 4.5 y 23.0 ± 1.9 mPa s, para las cepas AT9 y ATCC9046, respectivamente. Al comparar estadísticamente las mayores viscosidades obtenidas hacia el final de cada cultivo, no se observaron diferencias significativas entre ambas cepas para cada condición de $VTO_{m\acute{a}x}$ evaluada, por lo que la viscosidad del caldo no se vio afectada por la mutación presente en la cepa AT9.

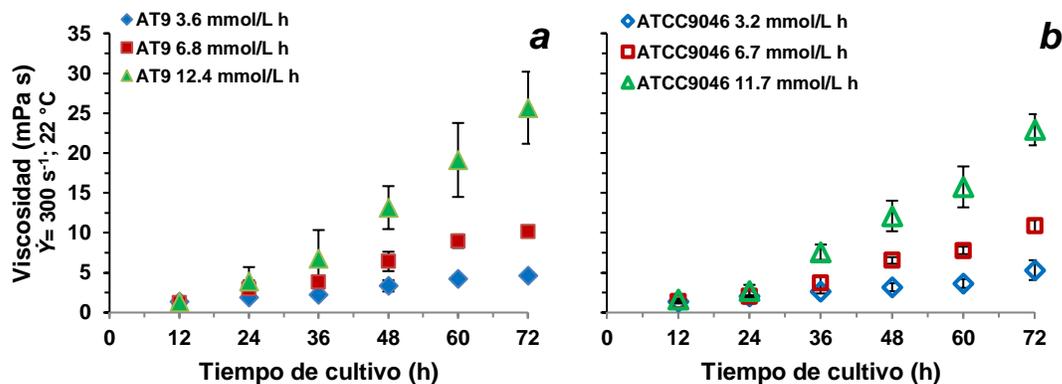


Figura 8.10. Viscosidad del caldo de cultivos de las cepas AT9 (a) y ATCC9046 (b) de *A. vinelandii* desarrollados a diferentes velocidades de transferencia de oxígeno máxima.

Al evaluar el aumento en la viscosidad del caldo, respecto al incremento en la $VTO_{m\acute{a}x}$, se observó que para ambas cepas, el incremento en la $VTO_{m\acute{a}x}$ condujo a un incremento en la viscosidad del caldo de cultivo. Dicho comportamiento contrasta con lo observado previamente en cultivos con la cepa ATCC9046 desarrollados en biorreactores y en matraces agitados, en

donde, el incremento en la VTO conduce a una disminución en la viscosidad del caldo de cultivo (Peña *et al.*, 2000; Gómez-Pazarín, 2015).

Para las condiciones de $VTO_{m\acute{a}x}$ de 3.6 y 6.8 mmol/L h con la cepa AT9, los valores de viscosidad (4.6 y 10.9 mPa s) se encontraron por debajo de la viscosidad reportada por García *et al.* (2020) de 27 mPa s para cultivos con la cepa AT9 en matraces agitados con una $VTO_{m\acute{a}x}$ de 5.2 mmol/L h. Sin embargo, este valor es comparable a la viscosidad obtenida en condiciones de alta $VTO_{m\acute{a}x}$ (12.4 mmol/L h) de 25.7 mPa s.

La figura 8.11 muestra las curvas de viscosidad en función de concentración del alginato producido durante el tiempo de cultivo. Para la cepa AT9, el incremento en la $VTO_{m\acute{a}x}$ mejoró la capacidad viscosificante del alginato, ya que al incrementarse la $VTO_{m\acute{a}x}$ de 3.6 a 6.8 y posteriormente a 12.4 mmol/L h, los valores de la CV se incrementaron de 0.54 a 1.18 y posteriormente a 3.16 mPa s L/g_{alginato}, respectivamente.

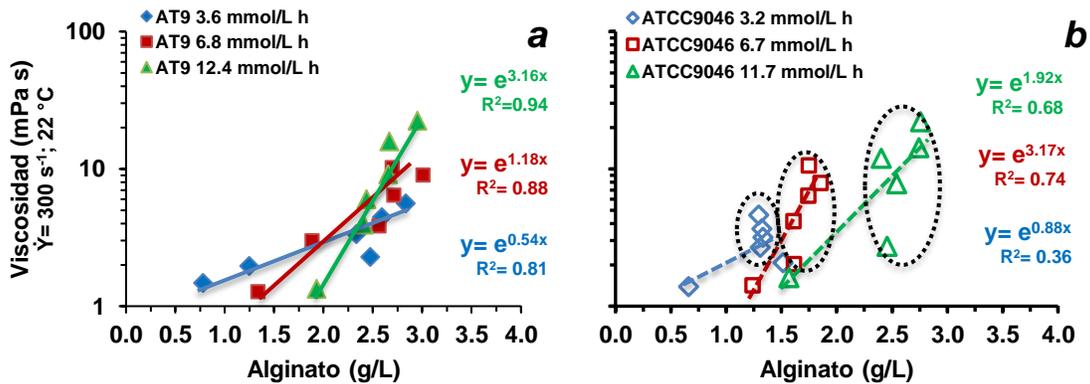


Figura 8.11. Relación viscosidad vs concentración del alginato del caldo de cultivos de *A. vinelandii* AT9 (a) y ATCC9046 (b) desarrollados a diferentes velocidades de transferencia de oxígeno máxima.

El valor de CV de 1.18 mPa s L/g_{alginato} obtenido en la condición intermedia de $VTO_{m\acute{a}x}$ es comparable a los valores típicos reportados para *A. vinelandii* ATCC9046 (~ 1.0 L/g de alginato) para diferentes valores de $VTO_{m\acute{a}x}$ (Peña, *et al.*, 2011; Gómez-Pazarín, *et al.*, 2015; Ramos, D., 2019). Sin embargo, este valor de CV de 1.18 mPa s L/g_{alginato} es inferior al valor de 1.75 mPa s L/g_{alginato} obtenido para la misma cepa cultivada en matraces agitados a un valor de $VTO_{m\acute{a}x}$

cercano (5.2 mmol/L h). Por otro lado, al cultivar a la cepa AT9 en condiciones de alta transferencia de oxígeno máxima (12.4 mmol/L h) es posible obtener alginato con capacidades viscosificantes 1.8 veces mayor a la obtenida en matraces agitados.

Para la cepa ATCC9046, no se observó un comportamiento claro, ya que al incrementarse la $VTO_{m\acute{a}x}$ de 3.2 a 6.7 mmol/L h, el valor de la CV se incrementó de 0.88 a 3.17 mPa s L/g_{alginato}, respectivamente. Pero al incrementarse la $VTO_{m\acute{a}x}$ a 11.7 mmol/L h, la capacidad viscosificante disminuyó a 1.92 mPa s L/g_{alginato}. El valor de CV de 3.17 mPa s L/g_{alginato} para la condición de $VTO_{m\acute{a}x}$ intermedia es comparable al valor obtenido en la condición de mayor $VTO_{m\acute{a}x}$ con la cepa AT9. Si bien, este mayor valor de CV justifica el hecho de que con la cepa ATCC9046 el caldo de cultivo haya alcanzado la misma viscosidad que con la cepa AT9 a una menor concentración de alginato, dicho valor de CV se encuentra muy por encima del valor comúnmente observado para la cepa ATCC9046 bajo diferentes estrategias de cultivo (Peña, *et al.*, 2011; Gómez-Pazarín, *et al.*, 2015; Ramos, D., 2019).

Los altos valores de CV obtenidos con la cepa ATCC9046 (en comparación con los obtenidos para la cepa AT9) posiblemente se derivan de que al graficar los datos de viscosidad en función de la concentración de alginato, la mayoría de los puntos se agrupan en un solo sector del plano (círculos punteados en negro, Figura 8.11b), derivado de que a partir de las 24 horas de cultivo la concentración del alginato fue constante (Figura 8.4), dando como resultado menores ajustes de determinación (R^2) como se muestra en la Figura 8.11, lo que sugiere que el modelo empleado para determinar los valores de CV se ajusta mejor para la cepa AT9 que para la cepa ATCC9046.

También, la falta de predecibilidad (bajos valores de R^2) del modelo empleado para calcular CV, se debe a que dicho modelo solo contempla la cantidad de producto y deja de lado las características químicas del mismo, las cuales pueden ser cambiantes durante el cultivo. Entonces, para tener un mejor ajuste del modelo, es necesario utilizar alginato con características químicas definidas, es decir, utilizar diferentes concentraciones de alginato con un peso molecular y/o grado de acetilación determinados.

Para ambas cepas, la viscosidad del caldo no se encontró ligada al incremento en la producción de alginato, ya que la concentración de alginato se mantuvo constante a partir de las 24 horas y la viscosidad del caldo comenzó a aumentar a partir de las 36 horas y fue al final del cultivo en donde se alcanzaron las mayores viscosidades. Por lo tanto, este incremento en la viscosidad del

caldo podría estar influenciado por las características químicas del alginato, como el peso molecular y/o el grado de acetilación.

Al evaluar el incremento en la viscosidad del caldo a través del tiempo de cultivo y en función del peso molecular del alginato (Figura 8.12), para ambas cepas, se puede observar que, a partir de que la viscosidad del caldo comienza a incrementarse de forma más notoria (a partir de las 36 horas), el peso molecular del alginato disminuyó o se mantuvo constante (Figura 8.12, zona sombreada en azul). También es importante destacar que en el momento en que se alcanzan los mayores pesos moleculares (Figura 8.12, zona sombreada en rojo), es cuando la viscosidad del caldo empezó a incrementarse ligeramente.

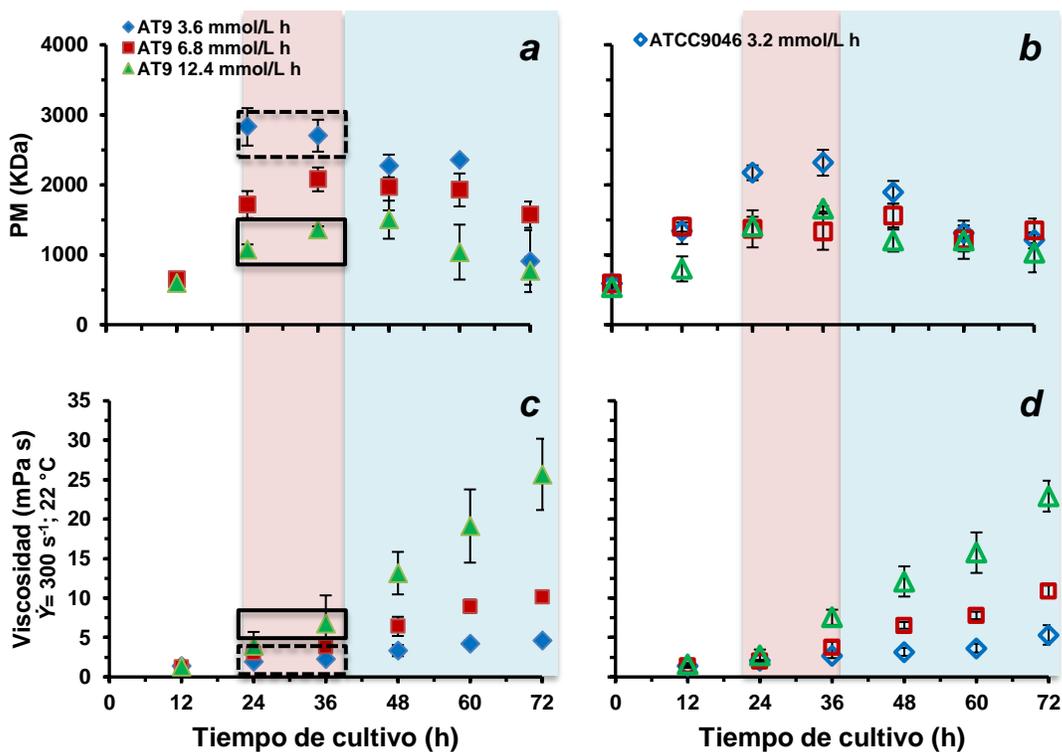


Figura 8.12. Comparación entre el peso molecular del alginato (a y b) y la viscosidad del caldo de cultivo (c y d) a través del tiempo de cultivo.

Otro aspecto importante a considerar es que, en presencia de alginato de menor peso molecular (1 500 – 1 700 kDa; Figura 8.12a, recuadro negro, línea continua) se generaron mayores viscosidades (7 – 13 mPa s; Figura 8.12c, recuadro negro, línea continua), respecto a mayores

pesos moleculares (2 000 – 2 900 kDa; Figura 8.12a, recuadro negro, línea punteada) donde la viscosidad del caldo fue menor (2 – 4 mPa s; Figura 8.12c, recuadro negro, línea punteada).

Por lo anterior, es posible inferir que el peso molecular no tiene efecto sobre la viscosidad del caldo, lo cual llama la atención, ya que, se ha reportado que el peso molecular del alginato influye directamente sobre la viscosidad del caldo de cultivo. Por lo tanto, este incremento en la viscosidad podría estar influenciado por alguna otra característica química del alginato, como el grado de acetilación o el contenido y/o distribución de los residuos GM.

Se sabe que en cultivos de *A. vinelandii* ATCC9046 en matraces agitados, pequeños cambios en el grado de acetilación impactan la viscosidad del caldo, independientemente del peso molecular del alginato (Peña *et al.*, 2006; Castillo *et al.*, 2013). Sin embargo, esto no se observó en el presente trabajo, ya que, si bien, el incremento en la $VTO_{m\acute{a}x}$ condujo a un incremento en la viscosidad del caldo y en el porcentaje de acetilación del alginato, durante el periodo en que aumentó la viscosidad del caldo (a partir de las 24 – 36 horas), el grado de acetilación se mantuvo constante e incluso disminuyó en algunos casos (Figura 8.13, zona sombreada en azul).

Entonces, dado que el grado de acetilación tampoco afectó a la viscosidad del caldo, el incremento en la viscosidad podría deberse a alguna otra característica química del alginato como la relación M/G o la distribución de los residuos de manuronato y guluronato a lo largo de la cadena de alginato.

La reticulación del alginato a través de la interacción entre los residuos de guluronato entre una misma o diferentes cadenas de alginato, podría ser la responsable del incremento en la viscosidad del medio. Sin embargo, esto implicaría una mayor presencia de residuos de guluronato. En este sentido, el grado de acetilación podría ser un indicador de la proporción G/M, ya que, los grupos acetilo se asocian solamente a los residuos de manuronato y a su vez, esta asociación protege a dichos residuos de la actividad epimerasa (Peña *et al.*, 1997; Castillo *et al.*, 2013). Por lo tanto, un menor grado de acetilación podría interpretarse como una relación G/M más alta, es decir, la producción de alginato con mayor contenido de guluronato. Sin embargo, no todos los residuos de manuronato son acetilados, por lo que sería necesario evaluar la relación G/M y la distribución de los residuos para corroborar dicha deducción.

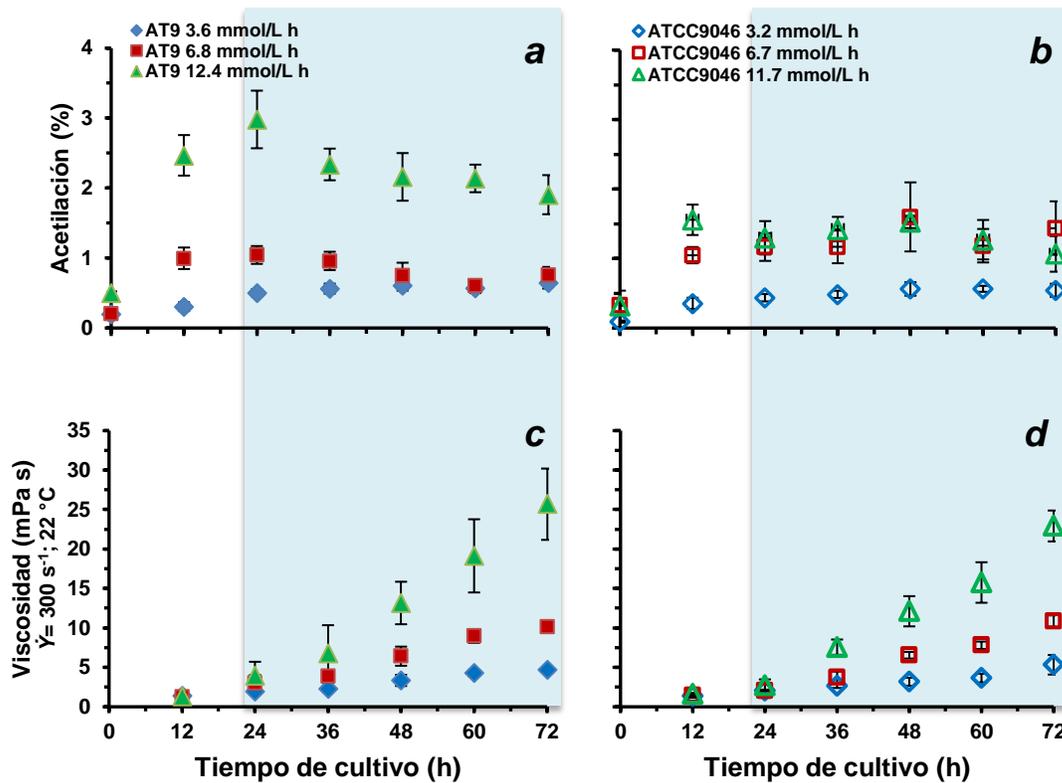


Figura 8.13. Comparación entre el grado de acetilación del alginato (a y b) y la viscosidad del caldo de cultivo (c y d) a través del tiempo de cultivo.

Lo anterior, solo explicaría en parte el incremento en la viscosidad para las condiciones de baja e intermedia VTO_{máx}, pero no para las condiciones a alta transferencia de oxígeno máxima.

Otro factor que podría ser responsable del incremento en la viscosidad del caldo hacia el final del cultivo, es el cambio del pH del medio durante el desarrollo del cultivo.

En la figura 8.14 se muestra el cambio del pH del caldo de los cultivos para la cepa AT9 (Figura 8.14a) y para la cepa ATCC9046 (Figura 8.14b). Para ambas cepas se puede observar un comportamiento similar para las tres condiciones de VTO_{máx} evaluadas. Para los cultivos de menor transferencia de oxígeno máxima, el pH final del caldo fue de 6.7, para la condición intermedia de VTO_{máx} fue de 6.4 y para la condición de mayor transferencia, el pH final fue de 5.8.

El incremento en la velocidad de transferencia de oxígeno máxima provocó una mayor caída en el pH del caldo de cultivo.

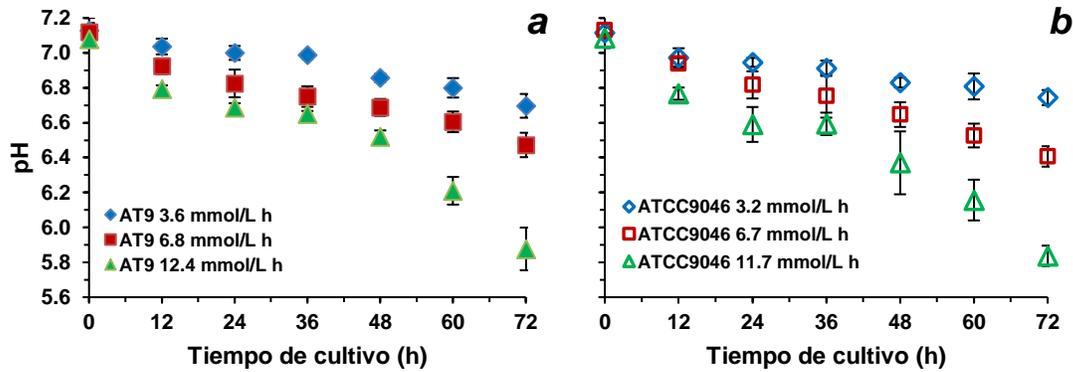


Figura 8.14. Cambio del pH en los caldos de cultivos de *A. vinelandii* AT9 (a) y ATCC9046 (b) desarrollados a diferentes velocidades de transferencia de oxígeno máxima.

Al comparar los perfiles de pH, con los perfiles de viscosidad del caldo (Figura 8.15), se puede observar una correspondencia inversa entre ambos parámetros, ya que la disminución en el pH se relaciona con el aumento en la viscosidad del medio. Esto concuerda con lo reportado por Bu *et al.* (2005) y por Masuelli and Illanes (2014) para el alginato en solución, en donde, a menores valores de pH, se favorece un mayor grado de reticulación entre las cadenas de alginato, lo que conduce a una mayor retención de agua y por tanto incrementa la viscosidad de la solución (ver sección 2.2)

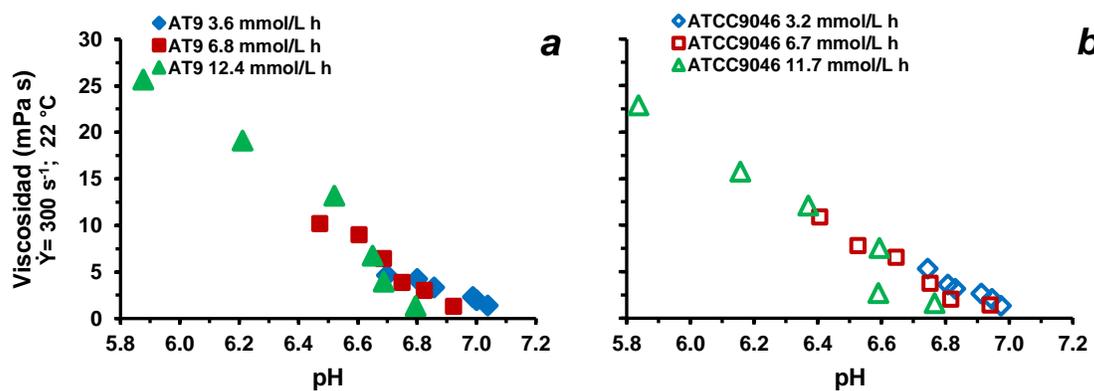


Figura 8.15. Relación entre el pH y la viscosidad del medio de cultivo para la cepa AT9 (a) y ATCC9046 (b) de *A. vinelandii*.

Por otro lado, esta relación observada entre el pH y la viscosidad del caldo no había sido reportado para los diferentes trabajos realizados con *A. vinelandii* ATCC9046 tanto en matraces como en reactores y el cambio en la viscosidad del caldo ha sido relacionado más a las diferentes características químicas del alginato, principalmente al peso molecular. Es importante mencionar que los trabajos reportados con las diferentes cepas de *A. vinelandii*, se han realizado en reactores y controlando el pH del medio en 7.2, lo que posiblemente haya permitido observar el efecto de las diferentes características químicas del alginato sobre la viscosidad del caldo de cultivo (Peña *et al.*, 2002; Lozano *et al.*, 2011; Castillo *et al.*, 2013), sin considerar si el cambio en el pH del medio podría tener algún efecto en la viscosidad del caldo.

Para el caso de los cultivos realizados en matraces agitados, controlar el pH es complicado, por lo que en estos sistemas el cambio en el pH a través del tiempo de cultivo, pueda ser el responsable (junto a las características químicas del alginato) de los altos valores de viscosidad que normalmente se obtienen en matraces (Gómez-Pazarín *et al.*, 2015; Peña *et al.*, 2011; García *et al.*, 2020). Para evaluar el efecto del pH sobre el alginato producido por la cepa AT9 en matraces agitados, en el grupo se realizaron cultivos con una concentración inicial de MOPS de 50 mM para mantener el pH constante en 7.2 (datos aún no reportados). Se observó que mantener el pH constante, condujo a un incremento en la concentración de alginato de dos veces respecto a los cultivos en donde no se controló el pH. Dicho aumento en la concentración de alginato resultó en un incremento de la viscosidad del caldo en un 50 %. Sin embargo, aunque se observaron diferencias en la viscosidad del caldo, estas no pueden ser atribuidas netamente al pH del medio, pues no se está considerando la contribución de parámetros como concentración, peso molecular, grado de acetilación, etc.

En este sentido, cuando la concentración, el grado de acetilación e incluso el peso molecular del alginato se mantienen constantes o sin muchos cambios (como fue el caso para el presente trabajo a partir de las 24 horas de cultivo), el pH del cultivo es el parámetro que posiblemente esté influyendo en la viscosidad del caldo en mayor grado que las características fisicoquímicas del alginato.

Otro parámetro que se sabe afecta la capacidad de reticulación del alginato y por tanto la viscosidad de la solución, es la fuerza iónica (Mirdarikhvande *et al.*, 2014). El efecto de la fuerza iónica sobre la reticulación del alginato depende del tipo y la concentración de los iones presentes en el medio, siendo en condiciones de mayor fuerza iónica donde se obtienen menores

capacidades de reticulación, debido a un efecto de detección de carga donde el incremento iónico causa una repulsión electrostática. Esta repulsión electrostática conduce a una disminución en la concentración de iones móviles entre el gel y la fase líquida, lo que a su vez, resulta en una disminución de la retención de líquido y por lo tanto en una menor viscosidad (Mirdarikhvande *et al.*, 2014). Sin embargo, en el presente trabajo, no se evaluó la fuerza iónica del medio, por lo que no es posible determinar el efecto de este parámetro sobre la viscosidad del caldo de cultivo.

9. CONCLUSIONES

- Con la cepa AT9 es posible obtener producciones de alginato de hasta 3 g/L en etapas tempranas del cultivo (36 h), independientemente de la condición de $VTO_{m\acute{a}x}$ en la que se desarrolle el cultivo.
- Al igual que la cepa ATCC9046, para la cepa AT9, la disminución en la velocidad de transferencia de oxígeno máxima del sistema (3.6 mmol/L h), conduce a un incremento en el peso molecular del alginato (2 927 kDa), específicamente en etapas tempranas del cultivo (24 – 36 horas).
- Para la cepa AT9, el incremento en la velocidad de transferencia de oxígeno máxima (12.4 mmol/L h) conduce a un incremento en la capacidad viscosificante de hasta 3.16 mPa s L/g del alginato producido. Sin embargo, para diferentes sistemas de cultivo bajo condiciones de velocidad de transferencia de oxígeno máxima cercanas (5.2 – 6.8 mmol/L h) la capacidad viscosificante del alginato puede verse afectada.
- Para ambas cepas, la viscosidad del caldo de cultivo no se vio afectada por el peso molecular ni por el grado de acetilación del alginato.
- La tendencia observada entre la viscosidad y el pH del caldo, sugiere que dicho parámetro podría estar teniendo un efecto inverso sobre la viscosidad del caldo de los cultivos con ambas cepas.

10. PERSPECTIVAS

- Evaluar el contenido y la distribución de los residuos de manuronato y guluronato en el alginato producido, así como su efecto en la viscosidad del caldo de cultivo.
- Evaluar el efecto del pH sobre la viscosidad, la concentración y las características fisicoquímicas del alginato producido por las cepas AT9 y ATCC9046 bajo las condiciones de $VTO_{m\acute{a}x}$ evaluadas, manteniendo el pH constante durante todo el cultivo.
- Evaluar la expresión y la actividad de las enzimas involucradas en la polimerización y depolimerización del alginato, así como del PHB.
- Evaluar la capacidad viscosificante del alginato producido por ambas cepas, bajo concentraciones de alginato específicas y a un mismo pH y fuerza iónica.
- Evaluar el peso molecular del alginato a través de una técnica absoluta como lo es la dispersión de luz dinámica para determinar el tamaño individual de las cadenas del polímero y no el de los agregados de cadenas que se forman por la reticulación del alginato.

11. REFERENCIAS

Ahumada-Manuel, C.L., Guzmán, J., Peña, C., Quiroz-Rocha, E., Espín, G. and Núñez, C. 2017. The signaling protein MucG negatively affects the production and the molecular mass of alginate in *Azotobacter vinelandii*. *Applied Genetics and Molecular Biotechnology*. 101, 1521 - 1534.

Ahumada-Manuel, C.L., Martínez-Ortíz, I.C., Hsueh, B.Y., Guzmán, J., Waters, C.M., Zamorano-Sánchez, D., Espín, G. and Núñez, C. 2020. Increased c-di-GMP levels lead to the production of alginates of high molecular mass in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*. 202, 120 - 134.

Bajaj, I. and Singhal, R. 2010. Effect of aeration and agitation on synthesis of poly(γ -glutamic acid) in batch cultures of *Bacillus licheniformis* NCIM 2324. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 15, 635-640.

Box, G.E.P., Hunter, W.G. and Hunter, J.S. 1989. *Estadística para investigadores. Introducción al diseño de experimentos, análisis de datos y construcción de modelos*. Barcelona. Editorial Reverté. 675 pp.

Brownlee, I.A., Allen, A., Pearson, J.P., Dettmar, P.W., Havler, M.E., Atherton, M.R. and Onsoyen, E. 2005. Alginate as a dietary fiber. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 45, 497 – 510.

BU, H., Kjoniksen, A.L. and Nyström, B. 2005. Effects of pH on dynamics and rheology during association and gelation via the Ugi reaction of aqueous alginate. *European Polymer Journal*. 41, 1 708 - 1 717.

Castillo, T., Galindo, E. and Peña, C. 2013a. The acetylation degree of alginates in *Azotobacter vinelandii* ATCC9046 is determined by dissolved oxygen and specific growth rate: studies in glucose-limited chemostat cultivations. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 40, 715-723.

Castillo, T., Heinzle, E., Peifer, S., Scheneider, K. and Peña, C. 2013b. Oxygen supply strongly influences metabolic fluxes, the production of poly(3-hydroxybutyrate) and alginate, and the degree of acetylation of alginate in *Azotobacter vinelandii*. *Process Biochemistry*. 48, 995 – 1 003.

- Castillo, T., García, A., Padilla-Córdova, C., Díaz-Barrera, A. and Peña, C. 2020. Respiration in *Azotobacter vinelandii* and its relationship with the synthesis of biopolymers. *Electronic Journal of Biotechnology*. 48, 36 - 45.
- Chamsartra, S., Hewitt, C.J. and Nienow, A.W. 2005. The impact of fluid mechanical stress on *Corynebacterium glutamicum* during continuous cultivation in an agitated bioreactor. *Biotechnology Letters*. 27, 693 - 700.
- Chanasit, W. Gonzaga, Z.J.C and Rhem, B.H.A. 2020. Analysis of the alginate O-acetylation machinery in *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Microbial and Cell Physiology*. 104. 2 179 - 2 191.
- Díaz-Barrera, A., Peña, C. and Galindo, E. 2007. The oxygen transfer rate influences the molecular mass of the alginate produced by *Azotobacter vinelandii*. *Applied Microbial and Cell Physiology*. 76, 903 – 910.
- Díaz-Barrera, A., Soto, E. and Altamirano, C. 2012. Alginate production and alg8 gene expression by *Azotobacter vinelandii* in continuous cultures. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 39, 613 – 621.
- Díaz-Barrera, A., Maturana, N., Pacheco-Leyva, I., Martínez, I. and Altamirano, C. 2017. Different responses in the expression of alginases, alginate polymerase and acetylation genes during alginate production by *Azotobacter vinelandii* under oxygen-controlled conditions. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 44, 1041 - 1051.
- Draget, K.I., Smidsrod, O. and Skjåk-Bræk, G. 2005. Alginate from algae. En: *Polysaccharide and polyamides in the food Industry*. Steinbüchel, A.; Rhee, S.K. (eds); Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.: Weinheim, 1-30.
- Ertesvåg, H. 2015. Alginate-modifying enzymes: biological roles and biotechnological uses. *Frontiers in Microbiology*. 6, 523 - 533.
- Fabia, J., Slusarczyk, C. and Gawłowski, A. 2005. Supermolecular structure of alginate fibers for medical applications studied by means of WAXS and SAXS methods. *Fibers & Textiles in Eastern Europe*. 13, 114 - 117.

- Flores, C., Moreno, S., Espín, G., Peña, C. and Galindo, E. 2013. Expression of alginases and alginate polymerase genes in response to oxygen, and their relationship with molecular weight in *Azotobacter vinelandii*. *Enzyme and Microbial Technology*. 53, 85 - 91.
- Franklin, M.J., Nivens, D.E. and Weadge, J.T. 2011. Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* extracellular polysaccharides, alginate, Pel and Psl. *Frontiers in Microbiology*. 167, 1 – 15.
- Galindo, E., Peña, C., Núñez, C., Segura, D and Espín, G. 2007. Molecular and bioengineering strategies to improve alginate and polyhydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii*. *Microbial Cell Factories*. 6, 7 - 23.
- García, A., Ferrer, P., Albiol, J., Castillo, T., Segura, D. and Peña, C. 2018. Metabolic flux analysis and the NAD(P)H/NAD(P)⁺ ratios in chemostat cultures of *Azotobacter vinelandii*. *Microbial Cell Factories*. 17, 10 - 23.
- García, A., Castillo, T., Ramos, D., Ahumada-Manuel, C.L., Núñez, C., Galindo, E., Büchs, J. and Peña, C. 2020. Molecular weight and viscosifying power of alginates produced by mutant strains of *Azotobacter vinelandii* under microaerophilic conditions. *Biotechnology Reports*. 26. e00436.
- García-Ochoa, F. and Gomez, E. 2009 Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: an overview. *Biotechnology Advances*, 27, 153 – 176.
- García-Ochoa, F., Gomez, E., Santos, V.E. and Merchuk, J.C., 2010. Oxygen uptake rate in microbial processes: An overview. *Biochemical Engineering Journal*. 49, 289 - 307.
- Gómez, E. 2020. Influencia de la velocidad de transferencia de oxígeno máxima máxima máxima bajo condiciones de microaerofilia sobre el peso molecular del poli-3-hidroxi-butarato (P3HB) en las cepas mutantes phbZ1- y OP de *Azotobacter vinelandii*. Tesis de Maestría. Maestría en Ciencias Bioquímicas Universidad Autónoma de México. Febrero, 2020.
- Gómez-Pazarín, K. 2015. Capacidad viscosificante del alginato producido por *Azotobacter vinelandii* en cultivos en matraces agitados sometidos a bajos consumos de potencia. Tesis de Maestría. Maestría en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México. Febrero, 2015.

- Gómez-Pazarín, K., Flores, C., Castillo, T., Büchs, J., Galindo, E. and Peña, C. 2015. Molecular weight and viscosifying power of alginates produced in *Azotobacter vinelandii* cultures in shake flasks under low power input. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 91, 1485 - 1492.
- Hay, I.D., Rehman, Z.U., Moradali, M.F., Wang, Y. and Rehm, B.H.A. 2013. Microbial alginate production, modification and its applications. *Microbial Biotechnology*.6, 637 - 650.
- Hengge, R., Häussler, S., Pruteanu, M., Stülke, J., Tschowri, N. and Turgay, K. 2019. Recent advances and current trends in nucleotide second messenger signaling in bacteria. *Journal of Molecular Biology*. 431, 908 - 927.
- Hewitt, C.J., Boon, L.A., McFarlane, C.M. and Nienow, A.W. 1998. The use of flow cytometry to study the impact of fluid mechanical stress on *E. coli* W3110 during continuous cultivation in an agitated bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*. 52, 672 – 684.
- Lin, L.P. and Sadoff, H.L. 1968. Encystment and Polymer Production by *Azotobacter vinelandii* in the Presence of β -Hydroxybutyrate. *Journal of Bacteriology*. 95, 2336 - 2343.
- Lee, K.Y. and Mooney, D.J. 2012. Alginate: Properties in biomedical applications. *Progress in Polymer Science*. Sci. 37, 106-126.
- Lewis, W.K. and Whitman, W.G. 1924. Principles of gas absorption. *Industrial and Engineering Chemistry*. 16, 1215 - 1220.
- Lowry, OH., Rosenbrough, NJ., Lewis, A., Farr, S. and Randall. RJ. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193:265–75.
- Lozano, E., Galindo, E. and Peña, C. 2011. Oxygen transfer rate during the production of alginate by *Azotobacter vinelandii* under oxygen-limited and non-limited conditions. *Microbial Cell Factories*. 10, 13 - 25.
- Maleki, S., Mærk, M., Hrudikova, R., Valla, S. and Ertesåg, H. 2016. New insight into *Pseudomonas fluorescens* alginate biosynthesis relevant for the establishment of an efficient production process for microbial alginates. *New Biotechnology*. 37, 2 – 8.

- Masuelli, M.A. and Illanes, C.O. 2014. Review of the characterization of sodium alginate by intrinsic viscosity measurements. Comparative analysis between conventional and single point methods. *International Journal of BioMaterials Science and Engineering*. 1, 1 - 11.
- Millan, M., Salazar, M., Segura, D., Castillo, T., Diaz-Barrera, A. and Peña, C. 2017. Molecular mass of Poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) produced by *Azotobacter vinelandii* is influenced by the polymer content in the inoculum. *Journal of Biotechnology*. 259, 50 - 55.
- Miller, G. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*. 31, 426 – 428.
- Mills, E., Pultz, I.S., Kulasekara, H.D. and Miller, S.I. 2011. The bacterial second messenger c-di-GMP: mechanisms of signaling. *Cellular Microbiology*. 13, 1 112 - 1 129.
- Mirdarikvande, S., sadeghi, H., Godarzi, A., Alahyari, M., Shasavari, H. and Khani, F. 2014. Effect of pH, and salinity onto swelling properties of hidrogel based on H-alginate-g-poly(AMPS). *Biosciences Biotechnology Research Asia*. 11, 205 - 209.
- Nalamothu, R., Potluri, A. and Muppalla, M.B. 2014. Review on marine alginates and its applications. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*. 4, 4006 – 4015.
- Pacheco-Leyva, I., Pexoa, F. and Díaz-Barrera, A. 2016. Alginate biosynthesis in *Azotobacter vinelandii*: Overview of molecular mechanisms in connection with the oxygen availability. *International Journal of Polymer Science*.
- Peña, C., Campos, N. and Galindo, E. 1997. Changes in alginate molecular mass distribution, broth viscosity and morphology of *Azotobacter vinelandii* cultured in shake flasks. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 48, 510 - 515.
- Peña, C., Miranda, L., Segura, D., Espín, G. and Galindo, E., 2002. Alginate production by *Azotobacter vinelandii* mutants altered in poly- β -hydroxybutyrate and alginate biosynthesis. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 29, 209 - 213.
- Peña, C., Hernández, L. and Galindo, E. 2006. Manipulation of the acetylation degree of *Azotobacter vinelandii* alginate by supplementing the culture medium with 3-(N-morpholino)-propane-sulfonic acid. *Letters in Applied Microbiology*. 43, 200 - 204.

- Peña, C., Galindo, E. and Büchs, J. 2011. The viscosifying power, degree of acetylation and molecular mass of the alginate produced by *Azotobacter vinelandii* in shake flasks are determined by the oxygen transfer rate. *Process Biochemistry*. 46, 290 – 297.
- Polk, A., Amsden, B., De Yao, K., Peng, T. and Goosen, F.A. 1992. Controlled release of albumin from chitosan-alginate microcapsules. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 83, 178 - 185.
- Ramos, D. 2019. Caracterización de la producción de alginato en las cepas de *Azotobacter vinelandii* OP AlgU+ y GG9 en diferentes condiciones de velocidades de transferencia de oxígeno máxima máxima. Tesis de licenciatura en Químico Industrial. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. 2019.
- RePMinghorst, U. 2007. Polymerization and export of alginate in *Pseudomonas aeruginosa*: Functional assignment and catalytic mechanism of Alg8/44.Ph's thesis. Doctor's degree in Philosophy in Microbiology. Massey University of New Zealand. June, 2007.
- Rezende, R.A., Bártolo, P.J., Mendes, A. and Filho, R.M, 2007. Rheological behavior of alginate solutions for biomanufacturing. *Journal of Applied Polymer Science*. 113, 3866 – 3871.
- Rehm, B. and Moradali, M. 2018. Alginates and their biomedical applications. Springer series in biomaterials science and engineering. 11. 27 – 37.
- Rhein-Knudsen, N., Ale, M.T., Ajalloueiian, F. and Meyer, A.S. 2017. Characterization of alginates from Ghanaian brown seaweeds: *Sargassum spp.* and *Padina spp.* *Food Hydrocolloids*. 71, 236 – 244.
- Riley, L.M., Weadge, J.T., Baker, P., Tipton, P.A., Ohman, D.E. and Howell, P.L. 2013., Structural and functional characterization of *Pseudomonas aeruginosa* AlgX. *Journal of Biological Chemistry*. 288, 22 299 - 22 314.
- Sandoff, H.L. 1975. Acystment and germination in *Azotobacter vinelandii*. *Bacteriological Reviews*. 39, 516 - 539.
- Skjåk-Bræk, G., Zanetti, F. and Paoletti, S. 1989. Effect of acetylation on some solution and gelling properties of alginates. *Carbohydrate Research*. 185, 131 - 138.

- Still, G.G. and Wang, C.H. 1964. Glucose catabolism in *Azotobacter vinelandii*. Archives of Biochemistry and Biophysics. 105, 126 - 132.
- Storz, H., Müller, K., Ehrhart, F., Gómez, I., Shirley, S., Gessner, P., Zimmermann, G., Weyand, E., Sukhorukov, V.L. Forst, T., Weber, M.W., Zimmermann, H., Kulicke, W.M, and Zimmermann, U. 2009. Physicochemical features of ultra-high viscosity alginates. Carbohydrate Research. 344, 985 - 995.
- Sun, J. and Tan, H. 2013. Alginate-based biomaterials for regenerative medicine applications. Materials. 6, 1285-1309.
- 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*. Applied Microbiology and Biotechnology. 63, 742 - 747.
- Urtuvia, V., Maturama, N., Acevedo, F., Peña, F. and Díaz-Barrera, A. 2017. Bacterial alginate production: an overview of its biosynthesis and potential industrial production. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 33, 198 – 208.
- Vicini, S., Mauri, M., Vita, S. and Catellano, M. 2018. Alginate and alginate/hyaluronic acid membranes generated by electrospinning in wet conditions: Relationship between solution viscosity and spinnability. Journal of Applied Polymer Science. 135, 1 - 8.
- Wilming, A., Begemann, J., Kuhne, S., Regestein, L., Bongaerts, J, Evers. S., Maurer, K.H. and Büchs, J. 2013. Metabolic studies of γ -poliglutamic acid production in *Bacillus licheniformis* by small-scale continuous cultivations. Biochemical Engineering Journal. 73, 29-37.
- Zou, X., Hang, H., Chu, J., Zhuang, Y and Zhang, S. 2009. Oxygen uptake rate optimization with nitrogen regulation for erythromycin production and scale-up from 50 L to 372 m³ scale. Bioresource Technology. 100, 1406 - 1412.