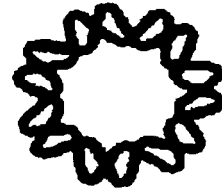


00591
22



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**



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

**El papel del complejo polimerasa, la alginato liasa y el oxígeno
disuelto en la biosíntesis y en la determinación del peso
molecular del alginato producido por *Azotobacter vinelandii***

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA:

M. en C. MAURICIO ALBERTO TRUJILLO ROLDÁN

Cuernavaca, Mor.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

2003

A



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

PAGINACIÓN DISCONTINUA

A la eterna memoria de mi padre, de quien continuo aprendiendo

A Adriana, por ser la inspiración de esta obra

2

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Agradecimientos

A Dr. Enrique Galindo por permitirme hacer parte de este grupo, por su valioso apoyo, por sus enseñanzas, su confianza, amistad e infinita paciencia durante todos estos años.
¡ Gracias Doc !

A la Dra. Guadalupe Espín por su constante motivación y por hacer este proyecto posible.

A los Doctores Carlos Peña y Leobardo Serrano-Carreón por su constante discusión en este proyecto, sus valiosos comentarios y su amistad.

A los miembros del Jurado, por sus valiosos comentarios:

Dra. Guadalupe Espín Ocampo

Dr. Enrique Galindo Fentanes

Dr. Mariano García-Garibay

Dr. Agustín López-Munguía Canales

Dr. José Luis Puente García

Dr. Sandino Estrada Mondaca

Dra. Brenda Valderrama Blanco

A Alejandra Rodríguez González por su incansable deseo de hacer de este proyecto una realidad.

A José Antonio Rocha V. por su ayuda incondicional, y en especial por su gran amistad.

A los "alginatos" de ayer y de hoy: el "Inge" Gabriel, Cesar, Rubén y Edith.

A mis amigos: Beto, Lolita, Vancha, Gaviota, Héctor, Erika, Rayo, Mario, Gerardo, Isadora, Rick de la Vega, Mainul, Sol y Solecita, EdgarSan, Nancy, Yimi, Celia, Karina, Vanc, Argel, Toño Serrato, Rita, Pavel, Pavelito, Los Sánchez-Cordero, Maru y Lourival, Sonia (la parce), Ponchito, Lucio y Camilo Montoya por los gratísimos momentos compartidos.

A todos los Galindos, Tonas y Possanis, gracias por todo.

A mi familia con todo mi cariño. Gracias Mamá por tu constante apoyo. A mis Hermanos Carlos, Adriana y Alejandro. A Tere por sus sabios consejos. A Naty, Juan y Don Juan por su calidez y amor sin límites. A Carlos Hdz y a Bibiana, los nuevos. A todos ellos infinitas gracias por ser mi refugio !.

D

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Índice general

	Página
Índice general	i
Índice de figuras	iv
Índice de tablas	vii
Resumen	1
Abstract	3
1. Introducción y justificación	5
2. Antecedentes	8
2.1. Generalidades	8
2.2. Alginatos	9
2.2.1. Estructura y propiedades físicas	9
2.2.2. Alginatos algales	11
2.2.3. Alginatos bacterianos	12
2.2.4. Función biológica del alginato bacterial	13
2.2.5. Aplicaciones de los alginatos	14
2.3. Generalidades de <i>Azotobacter vinelandii</i>	16
2.3.1. Biosíntesis de alginato por <i>A. vinelandii</i>	17
2.4. Factores que influyen en la biosíntesis y el peso molecular del alginato por <i>A. vinelandii</i>	21
2.4.1. Efecto de las condiciones de cultivo sobre la polimerización y depolimerización alginato por <i>A. vinelandii</i>	24

	<i>Índices</i>
3. Objetivos	27
3.1. General	27
3.2. Específicos	27
4. Materiales y métodos	28
4.1 Microorganismo, medio de cultivo y condiciones de crecimiento	28
4.2 Métodos analíticos	30
4.2.1 Determinación de la biomasa	30
4.2.2 Determinación de biomasa por turbidimetría	30
4.2.3. Determinación de sacarosa por el método de β -fructofuranosidasa – DNS	31
4.2.4. Extracción y cuantificación de alginato	32
4.2.5. Determinación de la viscosidad	32
4.2.6. Distribución de pesos moleculares	32
4.2.7. Cuantificación de la actividad alginato-liasa (alginasa) extracelular	33
4.2.8. Determinación de proteína extracelular	35
5. Estrategia experimental	37
6. Resultados y discusión	39
6.1. Caracterización de mutantes incapaces de producir alginasa	40
6.1.1. Caracterización de la mutante SML2 en matraces convencionales	43
6.1.2. Caracterización de la mutante SML2 en cultivo en fermentador	46
6.2. El proceso de inoculación determina la cinética de los cultivos	52
6.2.1 Comparación del proceso de inoculación utilizando la cepa silvestre ATCC 9046	52
6.2.2. Comparación del proceso de inoculación utilizando la cepa mutante SML2	57

6.3. El papel de la TOD en el desempeño del complejo polimerasa y la alginasa en la determinación del peso molecular del alginato	62
7. Conclusiones	77
8. Bibliografía	79
9. Anexos	87

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Índice de figuras

	Página
Figura 2.1. Estructuras secundarias del ácido algínico. Ácido polimanurónico, ácido poligulurónico y ácido algínico.	10
Figura 2.2. Ruta de biosíntesis de alginato en <i>A. vinelandii</i> .	18
Figura 2.3. Esquema general del grupo de genes biosintético de alginato en <i>A. vinelandii</i> .	19
Figura 2.4. Modelo de las enzimas involucradas en la producción de alginato por <i>A. vinelandii</i>	21
Figura 6.1. Crecimiento en cajas Petri y determinación de la actividad alginato liasa en medio sólido de la mutante no mucoide SML1 y la mucoide SML2 y de la cepa silvestre ATCC 9046.	41
Figura 6.2. Cinéticas de crecimiento de biomasa, producción de alginato, consumo de sacarosa, viscosidad del caldo, peso molecular promedio e índice de polidispersión de cultivos llevados a cabo con la cepa silvestre y la mutante SML2 en matraces convencionales.	44
Figura 6.3. Cinéticas de crecimiento de biomasa, producción de alginato, consumo de sacarosa, viscosidad del caldo, peso molecular promedio e índice de polidispersión de cultivos llevados a cabo a 3 % de TOD y 300 rpm usando la cepa silvestre y la mutante SML2.	48
Figura 6.4. Distribuciones de peso molecular a diferentes tiempos de cultivo de los cultivos llevados a cabo a 3 % de TOD y 300 rpm usando la cepa SML2.	51

Figura 6.5. Cinéticas de crecimiento de <i>A. vinelandii</i> ATCC 9046, producción de alginato, viscosidad del caldo, peso molecular promedio, índice de polidispersión y actividad específica alginasa de cultivos inoculados convencionalmente y con células lavadas llevados a cabo a 3 % de TOD.	54
Figura 6.6. Cinéticas de crecimiento de <i>A. vinelandii</i> SML2, producción de alginato, viscosidad del caldo, peso molecular promedio, índice de polidispersión y actividad específica alginasa de cultivos inoculados convencionalmente y con células lavadas llevados a cabo a 3 % de TOD.	58
Figura 6.7. Distribuciones de peso molecular de alginatos producidos en el inóculo, en los cultivos inoculados con células lavadas y en los inoculados convencionalmente. Cultivos llevados a cabo con la cepa silvestre y con la cepa mutante SML2.	60
Figura 6.8. Cinética de crecimiento de biomasa, concentración de alginato, peso molecular promedio, índice de polidispersión y actividad específica alginasa de cultivos de <i>A. vinelandii</i> ATCC 9046 y SML2 llevados a cabo a 3 % de TOD.	63
Figura 6.9. Cinética de crecimiento de biomasa, concentración de alginato, peso molecular promedio, índice de polidispersión y actividad específica alginasa de cultivos de <i>A. vinelandii</i> ATCC 9046 y SML2 llevados a cabo a 5 % de TOD.	65
Figura 6.10. Cinética de crecimiento de biomasa, concentración de alginato, peso molecular promedio, índice de polidispersión y actividad específica alginasa de cultivos de <i>A. vinelandii</i> ATCC 9046 y SML2 llevados a cabo a 1 % de TOD.	66

Figura 6.11. Efecto de TOD sobre la biomasa y alginato final, peso molecular promedio máximo y el índice de polidispersión del alginato y la actividad específica máxima alginasa en los cultivos llevados a cabo con las cepas SML2 y ATCC 9046	67
Figura 6.12. Efecto de TOD sobre la velocidad específica de crecimiento, rendimiento de alginato sobre biomasa, velocidad específica de producción de alginato y velocidad específica de consumo de sacarosa en los cultivos llevados a cabo con las cepas SML2 y ATCC 9046.	70
Figura 6.13. Distribuciones del peso molecular del alginato producido por <i>A. vinelandii</i> ATCC 9046 y SML2 en cultivos llevados a cabo a 1, 3 y 5 % de TOD, a diferentes tiempos de cultivo.	72

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Índice de tablas

	Página
Tabla 2.1. Composición de los alginatos de diversas especies.	11
Tabla 2.2. Propiedades funcionales y usos industriales de los alginatos.	15
Tabla 5.1. Producción de alginato en cultivos en cajas Petri de las cepas de <i>A. vinelandii</i> .	42

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Resumen

La importancia industrial del alginato radica en sus características reológicas y gelificantes que dependen en gran medida del peso molecular. En *Azotobacter vinelandii* la polimerización y la depolimerización (pasos implicados en la determinación del peso molecular) han sido poco estudiados y aún son poco entendidos. Se cree que en la polimerización del alginato están involucradas al menos cuatro proteínas (formando un complejo "polimerasa"), mientras que una sola proteína, la alginasa, es la responsable de la depolimerización. Este último fenómeno (la depolimerización) es una situación indeseable en términos de los usos potenciales del alginato.

El objetivo principal de este trabajo consistió en entender los papeles del complejo polimerasa y la alginato-liasa en la biosíntesis y principalmente en la determinación del peso molecular del alginato por *A. vinelandii*. Se utilizó una cepa mutante que lleva una mutación no polar (SML2) dentro de *algL* (el gen que codifica para la alginasa), lo cual inactiva la producción de alginasas pero que produce del alginato. Se caracterizó la cepa mutante SML2 y se comparó con la cepa parental en cultivos en matraces y en fermentador. Los resultados indicaron que en los cultivos con la mutante no se presentó depolimerización del alginato y que la actividad de AlgL no es necesaria para la producción de alginatos.

Disminuir el mayor número de variables posibles con el fin de estudiar el fenómeno de la polimerización implicaba la realización de cultivos bajo condiciones controladas. Sin embargo, la manera como se estaban inoculando los cultivos en fermentador involucraba la adición del medio agotado del cultivo semilla al fermentador, incluyendo el alginato y la alginato-liasa presintetizados. Se llevaron a cabo cultivos inoculados con células lavadas y cultivos inoculados convencionalmente usando las cepas SML2 y ATCC 9046. El alginato con más alto peso molecular promedio (PMP) se obtuvo en los cultivos llevados a cabo con células lavadas (1250 y 1050 kDa, para la cepa silvestre -ATCC 9046- y la mutante SML2, respectivamente) que los PMP obtenidos en los cultivos inoculados convencionalmente

(350 y 625 kDa para ATCC 9046 y SML2). En los cultivos inoculados con células lavadas de la cepa silvestre, la concentración final del polímero fue 27 % menor que con los cultivos inoculados convencionalmente y se encontró el máximo de actividad de la alginasa al fin de la fase exponencial de crecimiento, mientras que para los cultivos inoculados convencionalmente ese máximo se presentó a la mitad de la fase exponencial. Estos datos indican que los componentes en el caldo agotado del inóculo desempeñan papeles reguladores importantes en la biosíntesis del alginato.

Los resultados de los cultivos inoculados con células lavadas indicaron que la actividad polimerizante de *A. vinelandii* era constante, es decir, se encontró la producción de una familia bien definida (de baja polidispersión) de alginatos con un alto PMP. La producción de estas familias de alginatos está estrechamente controlada por la tensión de oxígeno disuelto (TOD). Por ejemplo, usando la cepa mutante SML2 se obtuvieron familias bien definidas con PMP de 150, 985 y 388 kDa a 1, 3 y 5 % de TOD, respectivamente. Los cultivos llevados a cabo con la cepa silvestre presentaron un comportamiento similar: una producción de familias bien definidas de alginatos con PMP de 370, 1250 y 350 kDa a 1, 3 y 5 % de TOD, respectivamente. Sin embargo, en los cultivos llevados a cabo con la cepa silvestre, al final de la fase exponencial de crecimiento, el alginato fue depolimerizado por la acción de la alginato-liasa. Los resultados indicaron que la polimerasa fabrica familias bien definidas de polímeros y que, a su vez, este proceso está estrechamente relacionado con la TOD. Por su parte, el papel de la alginasa (presente en la cepa silvestre) tiene una función de modificación del PMP del polímero, pero restringida a la post-polimerización del alginato.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Abstract

The industrial importance of the alginate involves its rheological and gel forming characteristics, which mainly depend on the molecular weight of this polymer. In *Azotobacter vinelandii* cultures the polymerization and the depolymerization steps (involved in the determination of the molecular weight) are still unknown. The polymerization of the alginate involves at least four proteins (forming the "polymerase" complex), whereas a single protein, alginate-lyase, is in charge of the depolymerization process. This phenomenon (depolymerization) is undesirable in terms of the potential uses of the alginate.

The main objective of this work was to understand the roles of the polymerase complex and the alginate-lyase in the alginate biosynthesis and how these two steps determine the molecular weight of the alginate produced by *A. vinelandii*. A mutant strain was used (SML2) having a non-polar mutation within *algL* (the gene which codifies for the alginate-lyase), which inactivates the production of alginate-lyase, but it is able to produce alginate. The mutant strain SML2 was characterized and compared with cultures conducted with the parental strain using shake flasks and fermenters. For the cultures using the mutant strain the depolymerization of the alginate did not occur. Furthermore, it was demonstrated that the activity of AlgL is not essential for alginate production.

In order to reduce the number of variables, and hence to be able to study the phenomenon of the polymerization, it was necessary to carry out cultures under very controlled conditions. As the inoculation procedure involved the addition of exhausted culture medium (from the inoculum's culture), which included the presynthesized alginate and alginate-lyase, cultures inoculated with washed cells were carried out using the strains SML2 and ATCC 9046. Cultures carried out with the conventional inoculation procedure were conducted as well for comparison. Alginate with higher mean molecular weight (MMW) was obtained in the cultures conducted with washed cells (1250 and 1050 kDa, for the wild strain - ATCC 9046- and mutant SML2, respectively) than that obtained in the

conventionally-inoculated cultures (350 and 625 kDa for ATCC 9046 and SML2, respectively). The final concentration of alginate in the cultures inoculated with washed cells (using the wild type strain) was 27 % lower than that observed in the conventionally-inoculated culture. The maximum alginate-lyase activity was found at the end of the exponential growth phase, whereas for the conventionally inoculated cultures, the maximum activity appeared during the exponential growth phase. This suggests that both components present in the exhausted inoculum broth play important regulatory roles in alginate biosynthesis and needs to be taken into account in (or avoided) in polymer biosynthesis.

Data from the cultures inoculated using washed cells indicated that the polymerizing activity of *A. vinelandii* was constant, *i.e.* it produces a defined family of alginates with a high MMW. The production of these alginate families is controlled by the dissolved oxygen tension (DOT). Using the SML2 strain, defined families of alginates having MMW of 150, 985 and 388 kDa were obtained at 1, 3 and 5 % of DOT, respectively. A similar behavior was observed using the wild type: a production of well defined families of alginates of MMW of 370, 1250 and 350 kDa at 1, 3 and TOD 5 %, respectively. At the end of the ATCC9046 fermentations, alginate was depolymerized by the action of lyases.

Overall, the evidence indicated that the polymerization process leading to the production of alginate produce families of the polysaccharide in a narrow MMW range, which in turn is highly dependent on DOT. The role of alginate-lyase (present in the wild type) is restricted to a post-polymerization step.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1. Introducción y justificación

Los alginatos son constituyentes importantes de las paredes celulares de las algas cafés (fcofitas) y están constituidos por cadenas lineales de los residuos de ácidos β -D-manurónico y α -L-gulurónico. Este producto es usado comercialmente en muchas aplicaciones, en las industrias farmacéutica, alimentaria, textil y de papel (Rehm y Valla 1997). Además de las algas y ciertas *Pseudomonas*, *Azotobacter vinelandii* constituye una buena opción para la obtención del alginato, por producir un alginato de características similares al obtenido de algas (Ertesvåg *et al.* 1996).

En la actualidad, se producen entre 35,000 y 40,000 toneladas de alginato con fines comerciales (Boswell 2002). La importancia del alginato radica en su capacidad para modificar las propiedades reológicas de los sistemas acuosos (Sutherland 1990). El precio en el mercado del alginato oscila entre los 4 y 10 dólares por kilogramo (Boswell 2002). Sin embargo, los alginatos de alta calidad y pureza usados por la industria farmacéutica alcanzan precios de hasta 4,000 dólares por kilogramo (Pszczola 1998; Boswell 2002).

Se han llevado a cabo numerosos estudios sobre la producción de alginato por *A. vinelandii* y sobre la influencia de muchos parámetros ambientales. Por ejemplo, se han reportado efectos de nutrimentos, del tipo y la cantidad de la fuente de carbono, de la temperatura de cultivo y del efecto de la tensión de oxígeno disuelto (Kurz y LaRue 1975; Jarman *et al.* 1978; Horan *et al.* 1981, 1983; Chen *et al.* 1985; Anninson y Couperwhite 1986; Kuhla y Oelze 1988; Brivonese y Sutherland 1989; Salvagi y Salvagi 1992; Sabry *et*

al. 1992; Clementi *et al.* 1995; Peña *et al.* 1997; Vermani *et al.* 1997; Parente *et al.* 1998; Peña *et al.* 2000; Trujillo-Roldán *et al.* 2001; Seáñez *et al.* 2001). De toda la gama de factores estudiados en el cultivo de *A. vinelandii*, se ha observado que uno de los parámetros claves en la producción de alginatos en cultivo es la tensión de oxígeno disuelto (TOD), tanto en matraces como en fermentador por lo que se han desarrollado al respecto un importante número de estudios (Horan *et al.* 1983; Chen *et al.* 1985; Brivonese y Sutherland 1989; Clementi *et al.* 1995; Peña *et al.* 1997; Parente *et al.* 1998; Sabra *et al.* 1999; Peña *et al.* 2000; Trujillo-Roldán *et al.* 2001). Se ha determinado que a bajos niveles de TOD se produce preferencialmente el polímero de reserva intracelular polihidroxibutirato (PHB), limitando la síntesis de alginato (Horan *et al.* 1981, 1983; Peña *et al.* 2000). A valores superiores a 5 % de TOD, se ha encontrado que el crecimiento de la bacteria se favorece (Horan *et al.* 1981; Peña *et al.* 2000) y cuando se requiere obtener cantidades apreciables de alginato, es necesario un control de TOD entre 2 y 5 % (Peña *et al.* 2000). Por otra parte, también se ha demostrado la importancia de la TOD en las características moleculares (peso molecular y distribución del peso molecular) de los alginatos producidos en fermentador (Peña *et al.* 2000; Trujillo-Roldán *et al.* 2001).

En *A. vinelandii*, los pasos biosintéticos que conducen a la formación de una unidad monomérica activada (GDP-manuronato) han sido bien caracterizados. Estos pasos implican la participación de los productos de tres genes, *algA*, *algC* y *algD* (Campos *et al.* 1996; Núñez *et al.* 2000a). Recientemente, los últimos pasos que están involucrados en las modificaciones post-polimerización, tales como la epimerización, acetilación y depolimerización, están comenzando a ser entendidos. Estos pasos implican la

participación de los productos de los genes *algE1-7*, *algG*, *algF* y *algL* (Ertesvåg *et al.* 1996; Lloret *et al.* 1996; Rehm *et al.* 1996; Ertesvåg *et al.* 1998; Svanem *et al.* 1999; Vázquez *et al.* 1999; Svanem *et al.* 2001). Sin embargo, el proceso intermedio en la biosíntesis del alginato, en el cual los intermediarios (monómeros u oligómeros) tienen que cruzar la membrana interna y ser polimerizados a ácido polimanurónico, sigue siendo desconocido. Los productos de los genes *alg8*, *alg44*, *algX* y *algK* (Mejía-Ruiz *et al.* 1997a, 1997b; Sabra *et al.* 2001) son candidatos a ser las subunidades del complejo polimerasa.

Entender cuáles son las funciones del complejo polimerasa y de la alginasa en la determinación del peso molecular del alginato por *A. vinelandii* y su relación con ciertas condiciones de cultivo (en especial la TOD) fueron los objetivos principales de este proyecto. Para ello se utilizaron dos cepas de *A. vinelandii*: una cepa silvestre (ATCC 9046) y una mutante incapaz de producir alginasas (SML2).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2. Antecedentes

2.1. Generalidades

Una gran variedad de bacterias han sido reportadas como productoras de exopolisacáridos. Este fenotipo se manifiesta como colonias mucoides en placa y también como cultivos de comportamiento reológico complejo. Los géneros más estudiados hasta ahora han sido: *Xanthomonas*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* y *Azotobacter*. Aunque aún no se ha definido totalmente la función de los exopolisacáridos en bacterias, se han propuesto algunas, entre las cuales están: la protección de sistemas enzimáticos sensibles a condiciones extremas del ambiente, la protección al ataque de fagos o desecación, la participación en el atrapamiento de iones metálicos y la participación como agentes adhesivos a superficies difíciles (Sutherland 1990; Ertesvåg *et al.* 1996; Clementi 1997; Rehm y Valla 1997; Gacesa 1998; Wong *et al.* 2000; Espín 2002).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El químico británico E.C.C. Stanford fue quien inicialmente describió la procedencia del alginato (“la preparación del ácido algínico de algas cafés”) en una patente otorgada en 1881 (Draget *et al.* 2001). Sin embargo, Stanford creía que el alginato contenía nitrógeno. En 1926, algunos grupos trabajando en forma aislada, encontraron que el ácido algínico sólo era constituido por ácidos urónicos. Sin embargo, no fue hasta 1955 cuando se descubrió que el alginato está constituido por dos tipos de ácidos urónicos: el ácido manurónico y su epímero, el ácido gulurónico (Draget *et al.* 2001). Hasta 1981 se habían reportado 265 géneros de algas que producían alginato (Clementi 1997; Miranda 1998). El alginato producido por el género *Macrocystis* es el más usado en Estados Unidos (Boswell 2002). En el norte de Europa, los géneros más usados son *Laminaria* y *Ascophyllum*

(Pszczola 1998). Las otras especies (*Durvillea*, *Sargassum* y *Laminaria japonica*) se han usado en menor escala en Australia, Chile, India, Filipinas y Japón (Clementi 1997; Miranda 1998; Peña 1998).

Bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Azotobacter* son las únicas fuentes procariotas que producen este polímero. La bacteria *Pseudomonas aeruginosa* (un patógeno humano oportunista, causante de la fibrosis quística) fue la primera en ser reportada como productora de alginato (Cohen 1963), ya que este polisacárido es esencial para la virulencia de la bacteria en los pulmones. Algunas especies del género de *Pseudomonas* (*P. mendocina* y *P. syringae*) también tienen la capacidad de producir alginato (Conti *et al.* 1994). El primer reporte de la producción de ácido alginico por *A. vinelandii* fue publicado por Gorin y Spencer (1966).

2.2. Alginatos

2.2.1. Estructura y propiedades físicas

El alginato obtenido de las algas marinas es un copolímero no ramificado de ácidos β -D-manurónico (M) y su epímero α -L-gulurónico (G), unidos siempre por enlaces glucosídicos β 1-4, como se presenta en la figura 2.1 (Rehm y Valla 1997; Gacesa 1998). Análisis previos han demostrado que este polímero está constituido por bloques M, bloques G y bloques M-G. La composición de estos bloques puede variar dependiendo de la especie y de las condiciones de cultivo, tal como lo describe la tabla 2.1 (Sutherland 1990; Gacesa 1998).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

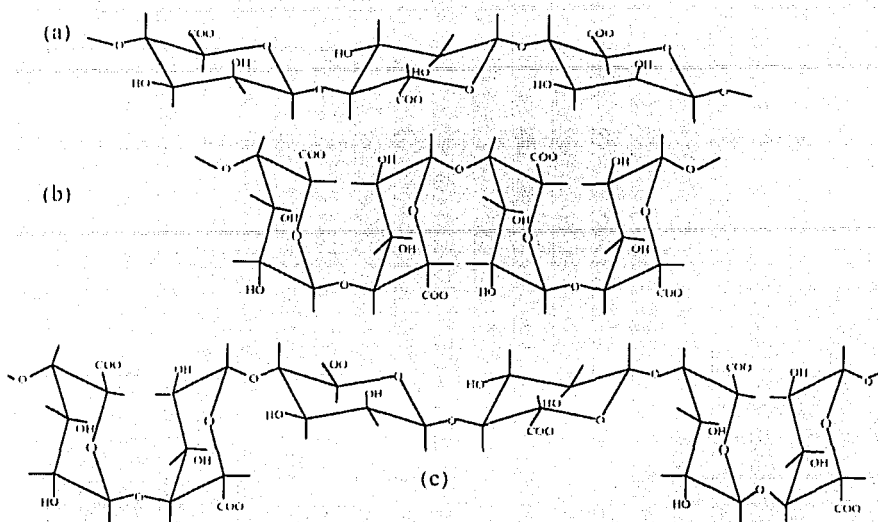


Figura 2.1. Estructuras secundarias del ácido alginico. a. Ácido polimanurónico (M). b. Ácido poligulurónico (G). c. Ácido alginico.

Las propiedades físicas del alginato son la base de su uso industrial. Por ejemplo, los alginatos, dependiendo de su composición, tienen alta afinidad para unirse a ciertos cationes polivalentes (Moe *et al.* 1995; Rehm y Valla 1997). Por otra parte, la solubilidad del alginato en agua está determinada por el pH y la fuerza iónica. La acidificación del medio conduce a una precipitación del alginato, dependiendo de su peso molecular, por lo que se puede precipitar y fraccionar usando altas concentraciones de sales como el cloruro de potasio (Moe *et al.* 1995). En general, el tipo de gel que se presenta en soluciones de alginato depende del número y de la fuerza de las uniones entre sus moléculas, como de la composición del polímero. En contraste, cuando en el polímero predominan los bloques de ácidos gulurónicos (G), el gel formado se vuelve completamente rígido y mucho más aún con la presencia de iones de calcio. Cuando el polímero está compuesto en su mayoría por

ácidos manurónicos, la rigidez del gel es menor (Sutherland 1990; Rehm y Valla 1997; Clementi 1997; Gacesa 1998).

Tabla 2.1. Composición de los alginatos de diversas especies (Sutherland 1990).

Especie	Relación M:G	Grupos Acetil (%)	Bloques Gulurónicos
Algal	Variable	0	+
<i>A. vinelandii</i>	Variable	21-50	+
<i>P. aeruginosa</i>	1:0	37-57	-
<i>P. putida</i>	0.6:0.4	3-4	-
<i>P. fluorescens</i>	0.6:0.4	3-4	-
<i>P. phaseolicola</i>	0.94:0.06	1	ND
<i>P. pisi</i>	0.83:0.17	4.5	ND

ND: No determinado.



2.2.2. Alginatos algales

Los alginatos son los constituyentes de la pared celular de las algas cafées (*Phaeophyceae*), la composición de sus bloques depende de la especie y de la parte del tallo de la cual el alginato es extraído. Además, el método de extracción, las condiciones ambientales y de cultivo del alga influyen en la variabilidad de la composición del alginato (Moc *et al.* 1995; Draget *et al.* 2001). El alginato está presente en casi todas las especies de las algas cafées, siendo rentable la extracción del polímero en aquellas especies donde el porcentaje del alginato sea mayor a un 40% en peso (Rehm y Valla 1997; Gacesa 1998).

Los principales países productores de alginato son los Estados Unidos (10,000 a 12,000 ton/año), China (8,000 a 10,000 ton/año), Inglaterra (6,000 a 8,000 ton/año),

Noruega (5,000 ton/año), Francia (2,000 ton/año) y Japón (1,500 ton/año) (Boswell 2002). Se estima además que para el año 2005 el mercado de los alginatos crecerá al menos un 4.5 %. En México la explotación comercial de algas se practica desde hace aproximadamente medio siglo. Las especies explotadas se distribuyen en el pacífico mexicano y son: el alga *Macrocystis pyrifera*, cosechada y exportada en fresco a Estados Unidos para la extracción de alginato, y otras como *Gigartina caniculata* fuente de carragenatos, y *Gelidium robustum* única especie que se cosecha y se industrializa en México para la producción de agar (Miranda 1998; Peña 1998; Hernández-Carmona 1999a, 1999b).

2.2.3. Alginatos bacterianos

Los alginatos de fuente bacteriana tienen la misma base estructural que los alginatos obtenidos de algas, pero difieren en que estos poseen un grupo acetil en el carbono dos o tres, en vez de un hidroxilo. El grado de acetilación de los polímeros bacteriales es variable, donde el alginato producido por *A. vinelandii* presenta, por cada 5.2 residuos de ácidos úronicos, uno acetilado (Gorin y Spencer 1966). Estas acetilaciones están siempre asociadas a los bloques manurónicos (Davidson *et al.* 1977). Mientras que el alginato producido por *A. vinelandii* está compuesto de ácido manurónico y gulurónico, el producido por *P. aeruginosa* no tiene bloques gulurónicos, lo que determina en gran medida las propiedades del producto (Sutherland 1990; Gacesa 1998). Una aproximación de las proporciones de los ácidos úronicos en cada especie bacteriana, comparando con los alginatos algales, se presenta en la tabla 2.1.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Aunque hasta ahora los alginatos comerciales han sido extraídos de algas marinas, es muy factible que el alginato producido por bacterias deje de ser sólo un modelo de estudio del mecanismo de biosíntesis y polimerización y se convierta en un exopolisacárido comercialmente importante (Ertesvåg *et al.* 1996; Gacesa 1998). Una de las grandes ventajas de los alginatos bacterianos es su diversidad estructural con respecto a su composición química, ya que se pueden obtener desde polímeros puros de ácido manurónico (con grandes expectativas en la industria de los inmunoestimulantes), hasta polímeros que contienen 80 % de residuos gulurónicos (Rehm y Valla 1997). El posible manejo de las enzimas involucradas en la biosíntesis del polímero (principalmente en la polimerización y modificación de la molécula) abre la posibilidad de manipular las características del alginato con usos potenciales aún no explorados (Anninson y Couperwhite 1986; Ertesvåg *et al.* 1996; Rehm y Valla 1997).

2.2.4. Función biológica del alginato bacterial

Se ha sugerido que los exopolisacáridos microbianos pueden proteger a las bacterias contra la desecación, ataque de fagos y fagocitosis. Además, pueden crear barreras difusionales a altas concentraciones de oxígeno, participar en el atrapamiento de iones metálicos, participar como agentes adhesivos a superficies difíciles y, en algunos casos, intervenir como agentes de consumo del exceso de energía en forma de ATP (Sutherland 1990; Clementi 1997; Ertesvåg *et al.* 1996; Gacesa 1998; Wong *et al.* 2000; Espín 2002).

A. vinelandii sufre un proceso de enquistamiento que es caracterizado por la formación de varias capas de alginatos alrededor de la célula, protegiéndola de la desecación y el estrés mecánico. Bajo condiciones favorables (incluyendo la presencia de agua y nutrimentos), la película de alginato se humedece, el quiste germina, se divide y regenera nuevamente células vegetativas. Por su parte, la acetilación que presenta el alginato cumple la función de incrementar las fuerzas de unión al agua, aumentando así las posibilidades de supervivencia en condiciones desecantes en el quiste (Ertesvåg *et al.* 1996; Vázquez *et al.* 1999). Se ha propuesto que el alginato cumple una función estructural en los microquistes que forma *A. vinelandii*. Sin embargo, esto no explica la abundante producción de alginato extracelular durante el crecimiento vegetativo de la bacteria. Así, el alginato no tiene una función única y como otros tantos polisacáridos, debe contribuir con una amplia gama de funciones que dependen del ambiente (Sutherland 1990). Las evidencias han sugerido que en *A. vinelandii* el alginato no sirve como un metabolito de reserva de energía (Kennedy y Toukdarian 1987). Alternativamente, se ha propuesto que el polímero funciona como una barrera protectora contra la toxicidad de metales pesados, como una barrera difusional de oxígeno y como un sistema de intercambio de iones (con alta selectividad por iones calcio), particularmente cuando el alginato está en estado de gel (Ertesvåg *et al.* 1996; Clementi 1997).

2.2.5. Aplicaciones de los alginatos

Los alginatos son usados comercialmente como agentes gelificantes, formadores de película para protección de alimentos, estabilizantes y espesantes (Tinoco 1993; Gacesa 1998). Un resumen de las aplicaciones más representativas puede verse en la tabla 2.2.

Tabla 2.2. Propiedades funcionales y usos industriales de los alginatos (López-Munguía *et al.* 1993; Gacesa 1998).

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

La producción mundial de alginato está centrada en un número pequeño de compañías, entre las que se destacan: *Danisco* en Dinamarca, *Kimitsu* y *Kibun Cemifa* en Japón, *Pronova Biopolymers Inc.* en Noruega, *Systems Bio-Industries* en Francia y *The Nutra Sweet Kelco Co.* en Estados Unidos. Los precios de venta están en el intervalo de 5 a 20 dólares por kilogramo, para la mayoría de las aplicaciones. Con este precio, los alginatos de origen bacteriano difícilmente podrían competir. Sin embargo, los alginatos usados en la industria farmacéutica pueden alcanzar precios de hasta 40,000 dólares por

kilogramo y por lo tanto, esta área puede convertirse en un mercado potencial para los biopolímeros generados por *A. vinelandii* (Rehm y Valla 1997; Pszczola 1998; Boswell 2002).

En los últimos años se han reportado nuevas aplicaciones biotecnológicas de los alginatos. El atrapamiento de células dentro de esferas de geles de alginato de calcio se ha convertido en una técnica extensamente usada para inmovilizar bacterias, algas, hongos, levaduras y células vegetales y animales. Los sistemas de células inmovilizadas en geles de alginato son utilizados en varios procesos industriales que se extienden desde la producción de etanol a la producción de anticuerpos monoclonales usando hibridomas (Clementi 1997; Pszczola 1998).

2.3. Generalidades de *Azotobacter vinelandii*

Las bacterias del género *Azotobacter* son microorganismos mucoides naturales del suelo, Gram-negativos y aerobios estrictos, móviles a través de flagelos peritricos. Son capaces de fijar nitrógeno y pueden incorporar ADN a su cromosoma por recombinación (Kennedy y Toukdarian 1987). *A. vinelandii* pertenece a la familia de los Azotobacteraceae.

Los productos de importancia comercial en la biosíntesis de *A. vinelandii* son el alginato y el polihidroxibutirato (PHB), un polímero de reserva intracelular. Las condiciones óptimas para la producción de PHB usualmente incluyen un exceso de fuente de carbono, agotamiento de un nutriente y bajo valor de oxígeno disuelto. Bajo estas condiciones se puede obtener hasta un 70 % de PHB en peso seco de las células (Brivonese y Sutherland 1989). Se

han diseñado procesos multi-etapas donde, en un primer tiempo, se promueve el crecimiento bacteriano y en el segundo se promueve la formación de PHB con adición de otra fuente de carbono, una fuente de nitrógeno adicional y baja aireación (Chen y Page 1997). También se ha descrito que los procesos de síntesis de alginato y de PHB están asociados al proceso de enquistamiento, el cual genera células esféricas y latentes, resistentes a la desecación (Kennedy y Toukdarian 1987).

2.3.1. Biosíntesis de alginato por *A. vinelandii*

La ruta biosintética de alginato en *A. vinelandii* fue inicialmente propuesta por Pindar y Bucke (1975) basándose en la presencia de algunas enzimas que previamente habían sido descritas como participantes en la síntesis de alginato en algas (Lin y Hassid 1966). A su vez, los pasos biosintéticos en la producción de alginato en *A. vinelandii* y *P. aeruginosa* son muy similares (Lynn y Sokatch 1984; Lloret *et al.* 1996). Como se presenta en la figura 2.2, la sacarosa es transportada al interior de la célula y una vez dentro, una invertasa la hidroliza liberando glucosa y fructosa. Luego de formarse las 2 hexosas-6-fosfato correspondientes tiene lugar la formación de manosa-1-fosfato por la acción de la enzima fosfomanosa isomerasa. Luego, la manosa-1-fosfato es esterificada con GTP por acción de la enzima GDP manosa pirofosforilasa, para obtener GDP-manosa. Por la acción de la GDP-manosa deshidrogenasa se obtiene GDP-ácido manurónico, que es el monómero precursor del ácido polimanurónico, obtenido por la acción del complejo enzimático "polimerasa" (Pindar y Bucke 1975; Espín 2002). Hasta la producción del GDP-ácido manurónico, el proceso sucede en el citoplasma de *A. vinelandii*. La polimerización del alginato se lleva a cabo en la membrana citoplasmática de la célula.

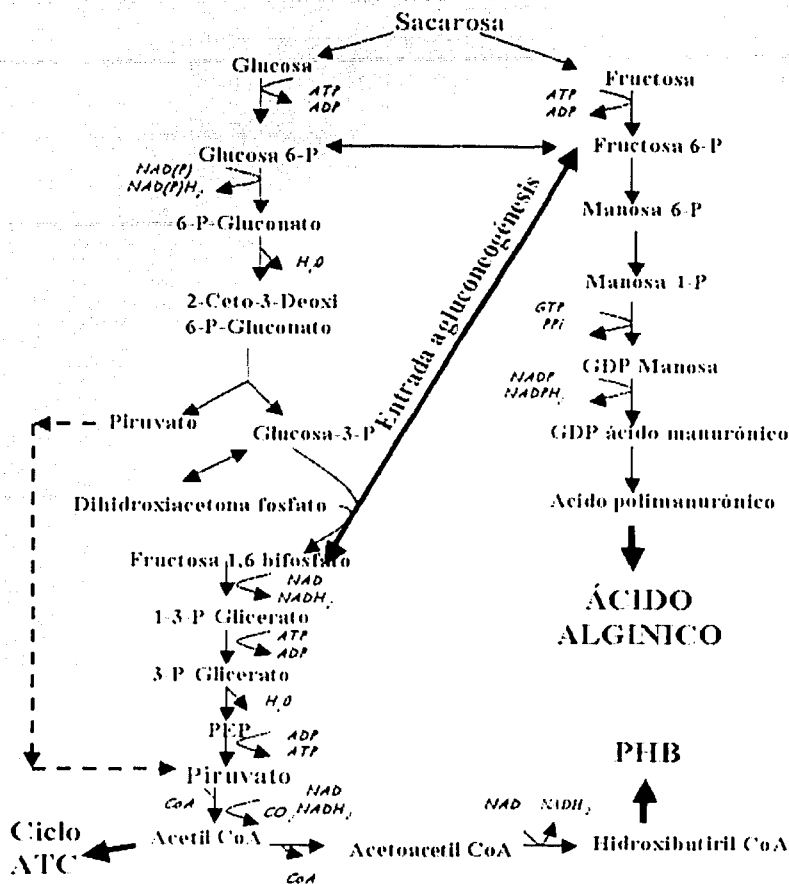


Figura 2.2. Ruta de biosíntesis de alginato y PHB en *A. vinelandii* (Sabra *et al.* 2001)

Las enzimas encargadas de modificar el ácido polimanurónico y darle la estructura y tamaño final al alginato se encuentran en el espacio periplásmico, membrana externa y espacio extracelular. Hasta el momento se reconoce un conjunto de siete epimerasas dependientes de calcio (Ertesvåg *et al.* 1996; Svanem *et al.* 1999; Ramstad *et al.* 2001; Svanem *et al.* 2001) y una sola epimerasa no dependiente de calcio (Rehm *et al.* 1996).

Además, se da la depolimerización del alginato por una alginato-liasa o alginasa (Ertesvåg *et al.* 1998) y una acetilación en el carbono 2 de los residuos de ácido manurónico por una acetilasa (Vázquez *et al.* 1999).

En la actualidad, no sólo se conoce la ruta biosintética del alginato, sino que también se conocen los genes responsables, su localización en el cromosoma y muchos de los mecanismos de regulación y control de la expresión de estos genes. Todos los genes estructurales se encuentran agrupados en el cromosoma y se transcriben a partir de varios promotores, con la excepción de *algC* que codifica para la enzima fosfomanomutasa. La figura 2.3 presenta un esquema general del grupo de genes biosintéticos de alginato en *A. vinelandii*.

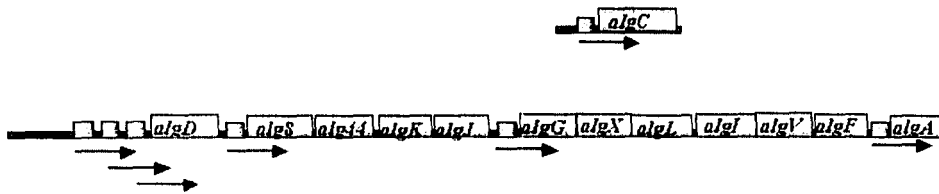


Figura 2.3. Esquema general del grupo de genes biosintético de alginato en *A. vinelandii* (tomado de Espín 2002).

El gen *algD* codifica para la enzima GDP-manosa deshidrogenasa y se transcribe a partir de tres promotores (Campos *et al.* 1996; Núñez *et al.* 2000a). Por otro lado, los genes *algS*, *alg44*, *algK* y *algJ* están organizados en una unidad transcripcional con un solo promotor (Mejía-Ruiz *et al.* 1997a, 1997b), cuyos productos (asociados a membrana interna) posiblemente estén involucrados en la polimerización y secreción del alginato (figura 2.4). El

producto de *alg8* es una glicosil transferasa membranal que se ha propuesto con actividad de polimerasa; *alg44* codifica para otra proteína de membrana interna, la cual se propone forma parte del complejo de polimerización o que tiene que ver con el transporte del polímero al periplasma (Mejía-Ruiz *et al.* 1997a). El producto de *algK* es una proteína periplásmica que pudiera ser parte del complejo polimerasa (Sabra *et al.* 2001) y también en la incorporación del producto de *algJ* en la membrana externa (Mejía-Ruiz *et al.* 1997b), como una proteína de membrana externa (figura 2.4) con actividad de canal iónico, esencial para la secreción del alginato (Rehm 1996). Después del operón conteniendo los genes *alg8*, *alg44*, *algK* y *algJ* se encuentra el operón *algGXLIVFA* (Vázquez *et al.* 1999), donde *algG* codifica para una epimerasa (Rehm *et al.* 1996) que no depende de calcio y *algL* codifica para la alginato-liasa (Lloret *et al.* 1996; Ertesvåg *et al.* 1998). Los productos de *algX*, *algY*, *algI* y *algF* son los responsables de la acetilación de los residuos manurónicos en el periplasma (Vázquez *et al.* 1999), aunque otros autores (Sabra *et al.* 2001) han propuesto que *algX* codifica para una enzima involucrada con el complejo polimerasa. Finalmente y precedido de un promotor debil, *algA* codifica para la enzima bifuncional (fosfomanosa isomerasa, DGP manosa pirofosforilasa) que cataliza el primer y tercer pasos de la vía (Lloret *et al.* 1996; Vázquez *et al.* 1999).

La expresión o transcripción de los genes estructurales de la vía de síntesis del alginato está bajo el control de una serie de proteínas reguladoras que incluyen factores sigma alternativos y sus reguladores negativos o antisigmas, así como la participación de proteínas reguladoras de la familia de dos componentes (Martínez-Salazar *et al.* 1996; Moreno *et al.* 1998; Núñez *et al.* 2000a, 2000b; Castañeda *et al.* 2000, 2001).

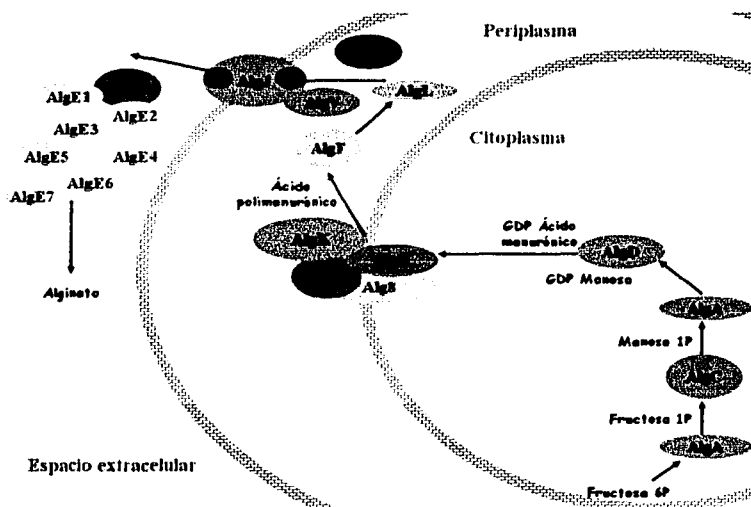


Figura 2.4 Modelo de las enzimas involucradas en la producción de alginato por *A. vinelandii*.

2.4. Factores que influyen en la biosíntesis y el peso molecular del alginato por *A. vinelandii*

Se han realizado estudios a fin de investigar el efecto de muchos de los factores que afectan la biosíntesis del alginato (nutrimentos, fuente de carbono, temperatura, pH y TOD, entre otros). El efecto de cada uno de estos factores ha sido cuantificado en términos cinéticos, tales como velocidades de crecimiento, velocidades de producción de alginato y consumo de fuente de carbono, rendimientos y productividades (Jarman *et al.* 1978; Horan *et al.* 1981, 1983; Chen *et al.* 1985; Brivonese y Sutherland 1989; Clementi *et al.* 1995; Peña *et al.* 1997; Parente *et al.* 1998; Peña 1998; Clementi *et al.* 1999; Trujillo 1999; Peña *et al.* 2000; Trujillo-Roldán *et al.* 2001; Seáñez *et al.* 2001).

En nuestro grupo de investigación se ha generado información sobre el efecto de la aireación y de la TOD en los cultivos de *A. vinelandii*, sobre la producción y peso molecular de los alginatos. Peña *et al.* (1997) llevaron a cabo cultivos de *A. vinelandii* en matraces con deflectores, donde las bacterias crecieron casi al doble y produjeron tres veces menos alginato que aquellos cultivos llevados a cabo en matraces convencionales. Las viscosidades más altas fueron aquellas de los cultivos en matraces convencionales (520 cps) con respecto a los matraces con deflectores (30 cps). Este último fenómeno fue relacionado con un cambio en las características moleculares del polímero (Peña *et al.* 1997). El peso molecular del alginato aumentó con respecto al tiempo de cultivo y posteriormente fue depolimerizado. Al final de los cultivos, el peso molecular promedio (PMP) del alginato de los matraces convencionales fue cinco veces mayor que el PMP del alginato de los matraces con deflectores. Posteriormente, en cultivos en fermentador, Peña *et al.* (2000) reportaron como la TOD (en el intervalo de 0.5 a 5 %) y la hidrodinámica (velocidades de agitación en el intervalo de 300 a 700 rpm) afectaban la producción de alginato así como el peso molecular del polímero. En condiciones de baja velocidad de agitación (300 rpm) y una alta TOD (5 %), el cultivo produjo más alginato (4.5 g/l) que lo obtenido a la misma agitación pero a una TOD de 0.5 % (1.0 g/l). Por otra parte, los valores más altos de PMP del alginato se obtuvieron a bajas velocidades de agitación. Además, el PMP del alginato obtenido fue función del oxígeno disuelto en el medio de cultivo (Peña *et al.* 2000). Por otra parte, en los tiempos finales de los cultivos, la depolimerización del alginato era causada por la actividad alginato-liasa extracelular (Peña *et al.* 2000). Anterior al trabajo de Peña *et al.* (2000) se reportaron otros trabajos que

demonstraron el efecto de la TOD sobre la producción de alginatos por *A. vinelandii*. Por ejemplo, en cultivos con y sin control de TOD, Parente *et al.* (1998) observaron que la mayor concentración final de alginato (3.8 g/l) es obtenida en los cultivos llevados a cabo sin control de TOD. Sin embargo, este cultivo sin control estuvo entre 2 y 4 % de TOD. El control de la TOD reportado por Parente *et al.* (1998) fue realizado mediante la manipulación de la velocidad de agitación, lo que no permitió separar los efectos causados por cambios en la hidrodinámica, de aquellos debidos exclusivamente a la TOD.

En un trabajo posterior de nuestro grupo, Trujillo-Roldán *et al.* (2001) reportaron el efecto de oscilaciones de TOD sobre el metabolismo de las bacterias y el alginato producido. Las oscilaciones sinusoidales de la TOD se llevaron a cabo con la manipulación de las presiones parciales del oxígeno y del nitrógeno en la entrada de un biorreactor de 1.0 l. Se evaluaron los efectos del período de oscilación (tiempo en que dura una oscilación) y de la amplitud de la onda (valor sobre el que oscila la TOD), con un eje de la oscilación fijo en 3 % de TOD. Se pudo observar que la amplitud de la oscilación tenía un efecto importante en el PMP del alginato. Sin embargo, nunca se obtuvieron alginatos de mayor PMP que el obtenido bajo una TOD constante de 3 % (350 kDa). Los resultados de este estudio hicieron evidente la compleja regulación que tiene *A. vinelandii* sobre cambios muy pequeños en la TOD, principalmente en las características moleculares del alginato. También se reportó (Trujillo-Roldán *et al.* 2001) que la depolimerización del alginato era evidente hacia el final del cultivo y, a su vez, la magnitud de la caída en el PMP parecía ser función de la TOD. Otro de los gases que ha sido estudiado en nuestro grupo ha sido el bióxido de carbono en la corriente de entrada de los gases (0 – 25 % v/v) y su efecto sobre

la producción y el PMP del alginato producido por *A. vinelandii* (Seáñez *et al.* 2001). El crecimiento de la biomasa y la producción del alginato fueron inhibidos a bajos niveles de CO₂ (4 – 8 %), pero estimulados a niveles altos (13 %). Uno de los resultados más dramáticos fue que para los niveles de CO₂ de 8% y 13% no se observó depolimerización del alginato (Seáñez *et al.* 2001).

2.4.1. Efecto de las condiciones de cultivo sobre la polimerización y depolimerización de alginato por *A. vinelandii*.

En algunos trabajos se ha mostrado cómo ciertas condiciones de cultivo (agitación, oxígeno disuelto, CO₂ y nutrimentos, entre otras) afectan el PMP y la distribución del peso molecular del alginato producido por *A. vinelandii* (Kennedy *et al.* 1992; Ertesvåg *et al.* 1998; Peña *et al.* 2000; Trujillo-Roldán *et al.* 2001; Seáñez *et al.* 2001). Además, también se ha intentado relacionar estas condiciones de cultivo con la posterior depolimerización del alginato (Trujillo 1999; Parente 1998). Parente *et al.* (1998) proponen una relación similar entre el aumento del PMP y la velocidad específica de crecimiento, mientras que Clementi (1997) presenta como la depolimerización del alginato coincide con el agotamiento de nutrimentos como la fuente de nitrógeno. Sabra *et al.* (1999) proponen que la fuente de fosfatos es el factor nutricional relacionado con la caída del PMP del alginato en cultivo. Estudios previos a estos, han propuesto que la causa principal de la degradación del polímero es la expulsión de la alginasa del espacio periplásmico de la célula al espacio extracelular por una lisis celular al final del cultivo (Horan *et al.* 1983).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Los reportes de Kennedy *et al.* (1992) y Ertesvåg *et al.* (1998) son los únicos que han tratado de entender el mecanismo de acción de la alginato liasa en *A. vinelandii*. De los dos reportes se puede concluir que la alginasa es normalmente periplásmica (95% en cultivos en matraz) y con pH óptimos cercanos a la neutralidad (Kennedy *et al.* 1992). El precursor pesa 41.4 kDa donde la enzima pesa 39 kDa y un péptido señal de 2.4 kDa (Ertesvåg *et al.* 1998). La alginato-liasa tiene alta afinidad por los enlaces de residuos de ácidos manurónicos y muy poca sobre las cadenas de residuos de ácidos gulurónicos.

Otros estudios se han llevado a cabo usando mutantes de *A. vinelandii* (normalmente la mutación se encuentra dentro del grupo de genes biosintéticos del alginato). Un ejemplo, es el trabajo en el que se reportan tres cepas mutantes con alteraciones en la transcripción de uno de los genes importantes de la producción de alginato (*algD*), en la síntesis de PHB y una doble mutante con las dos mutaciones anteriores. En ninguno de los casos, la producción de alginatos fue mejorada con respecto a la cepa silvestre (Peña *et al.* 2002). Sin embargo, la doble mutante produjo un PMP casi tres veces más alto que el mayor reportado para la cepa silvestre, aunque se desconoce el mecanismo por lo que esto sucede (Peña *et al.* 2002).

Además, existen reportes sobre alginato liasas de otros modelos biológicos. La recopilación más reciente de esta información fue realizada por Wong *et al.* (2000). La mayor parte de los estudios se han realizado en las especies de *Pseudomonas* (Hatch y Schiller 1998; Rehm 1998; Preston *et al.* 2000; Preston *et al.* 2001; Otto *et al.* 2001) y en algunas bacterias marinas (Brown y Preston 1991; Iwamoto *et al.* 2002).

Ninguno de los trabajos previos ha demostrado claramente cómo se llevan a cabo los fenómenos de polimerización y depolimerización. Entender cuáles son las funciones del complejo polimerasa y de la alginasa en la determinación del peso molecular del alginato por *A. vinelandii* fue el objetivo principal de este proyecto. Para cumplir tal fin se utilizaron dos cepas de *A. vinelandii*: una cepa silvestre (ATCC 9046) y una mutante incapaz de producir alginasas (SML2). Además, se propuso el uso de una nueva metodología de inoculación al fermentador (inocular células lavadas). Con esta nueva metodología se propuso analizar el efecto de la TOD sobre los fenómenos de polimerización y depolimerización como uno de los factores más importantes en el cultivo de *A. vinelandii*, la producción y el PMP del alginato.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3. Objetivos

3.1. General

- Entender y caracterizar el papel de la alginato liasa y del complejo polimerasa (bajo diferentes condiciones de oxígeno disuelto) en la determinación del peso molecular del alginato producido por *Azotobacter vinelandii*.

3.2. Específicos

- Obtener y caracterizar (en matraces y en fermentador) una mutante de *A. vinelandii* no productora de alginasas, pero que sí pueda producir alginato.
- Realizar cultivos de *A. vinelandii* en fermentador donde sea posible evitar los componentes provenientes del inóculo, con el fin de lograr un análisis apropiado del alginato y su peso molecular bajo condiciones controladas.
- Analizar el efecto de la TOD sobre los fenómenos de polimerización y depolimerización del alginato.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4. Materiales y métodos

4.1 Microorganismo, medio de cultivo y condiciones de crecimiento

La cepa de *Azotobacter vinelandii* ATCC 9046 se preservó a 4°C en tubos inclinados con medio Burk modificado solidificado con agar (18 g/l) (ver composición adelante), sin extracto de levadura. El mantenimiento se realizó con resiembras mensuales como ha sido descrito previamente (Peña *et al.* 1997).

El microorganismo se creció en medio Burk modificado (MBM) con la siguiente composición (en g/l): sacarosa (20); extracto de levadura (3); K₂HPO₄ (0.66); KH₂PO₄ (0.16); MOPS - ácido 3 (N-morfolino) propanesulfónico - (1.42); CaSO₄ (0.05); NaCl (0.2); MgSO₄·7H₂O (0.2); NaMoO₄·2H₂O (0.0029); FeSO₄ (0.027). Las sales de potasio, la sacarosa, el extracto de levadura y el MOPS se disolvieron en 900 ml de agua destilada y se ajustó el pH a 7.2 con NaOH (2N). A su vez, el sulfato de calcio se disolvió en 50 ml y las sales restantes en el mismo volumen de agua destilada. Con el objeto de evitar precipitaciones, las tres fracciones se esterilizaron por separado a 121°C durante 20 min y ya estériles se mezclaron en la campana de flujo laminar (Peña *et al.* 1997; Peña 1998; Trujillo 1999).

Para la obtención de los inóculos, se resembró, de los tubos inclinados a medio sólido (cajas Petri) y se incubó (por duplicado) a 29°C durante 72 horas. Tres asadas de las células de las placas fueron usadas para inocular los matraces, los cuales se incubaron (por triplicado) durante 24 horas a 29°C y una velocidad de agitación de 200 rpm. El matraz seleccionado

(cuya densidad óptica inicial era cercana a 0.15 en dilución 1:50 y que representaba 0.3 g/l de biomasa en el fermentador al comenzar el cultivo) fue usado como inóculo de los cultivos en fermentador y en matraces. Los cultivos en matraces se llevaron a cabo usando matraces Erlenmeyer de 500 ml con 100 ml de medio de cultivo. En condiciones estériles, 10 ml de inóculo se adicionaron a 90 ml de MBM en cada matraz. Se incubaron 24 matraces, sacrificando dos matraces cada 12 h para posteriores análisis. Se utilizó una velocidad de agitación de 200 rpm y 29°C (agitadora New Brunswick Sci, serie 25). Para cada cepa de trabajo, los resultados que se presentan son el promedio del análisis por duplicado de dos matraces.

Para los cultivos en fermentador se usó un biorreactor de 1.5 l con un volumen inicial de trabajo de 1.0 l (Virtis, Gardiner NY). El biorreactor está equipado con dos turbinas Rushton (relación de diámetros de impulsor a tanque de 0.5), de 6 paletas planas y un difusor de 5 orificios para efectuar la aireación por burbujeo. El pH fue controlado a 7.2 de forma *on-off*, mediante la adición automática de NaOH (2 N), por un amplificador-controlador de pH (Ingold 2300, Columbus OH) ayudado de una bomba peristáltica. La tensión de oxígeno disuelto (TOD) se midió mediante un electrodo polarográfico de oxígeno (Mettler-Toledo, Columbus OH), su señal fue transmitida a un amplificador de oxígeno (Ingold, Columbus OH) y adquirida por una computadora PC Compaq Presario. La TOD fue controlada en línea usando un programa escrito en *LabView* (Trujillo-Roldán *et al.* 2001). Los cultivos a TOD constante se mantuvieron a 1, 3 y 5 % mediante la manipulación de la presión parcial de nitrógeno y oxígeno en la alimentación, a través de controladores de flujo másico (Brooks Instruments 0154E) y usando un algoritmo de control proporcional-integral-derivativo

(Trujillo-Roldán *et al.* 2001). Las fermentaciones se llevaron a cabo a un flujo constante de la mezcla de gases de 800 ccpm, a 29°C y velocidad de agitación de 300 y 700 rpm. Con el sistema descrito se pudo controlar satisfactoriamente la TOD en valores cercanos al *set point*.

4.2 Métodos analíticos

4.2.1 Determinación de la biomasa

La determinación de biomasa se llevó a cabo por un método gravimétrico de peso seco (en g/l) previamente descrito (Peña *et al.* 1997; Peña 1998; Trujillo-Roldán *et al.* 2001): se mezclaron 10 ml de caldo de cultivo con 1.0 ml de Na₂EDTA (0.1 M) y 1.0 ml de NaCl (1.0 M). Se centrifugó a 15,500 x g por 20 minutos (centrífuga Eppendorf 5804). Se separó el sobrenadante y posteriormente el centrifugado (paquete celular), se lavó con una mezcla de 0.1 M EDTA : 1 M NaCl (1:1 v/v). El paquete celular fue filtrado al vacío a través de membranas *Nucleopore* de 0.45 µm de tamaño de poro, previamente taradas. La membrana fue secada por 24 horas a 70°C en estufa (Felisa), para finalmente pesarse y obtener (por diferencia de peso) la cantidad de biomasa.

4.2.2 Determinación de biomasa por turbidimetría

Se tomó una alícuota de 1.0 ml del caldo de fermentación y se diluyó 1/50 con agua destilada. Posteriormente, se leyó la absorbancia de la muestra a 540 nm en un espectrofotómetro Beckman modelo DU 650. Los valores se usaron como una manera rápida de determinar el crecimiento bacteriano en el medio (Miranda 1998; Peña 1998; Trujillo 1999).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4.2.3. Determinación de sacarosa por el método de β -fructofuranosidasa – DNS

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

La solución de DNS se preparó pesando 16 g de NaOH, 300 g de tartrato de sodio y 10 g de DNS y se mezclaron en este orden en 1.0 l de agua destilada, calentando para una disolución total, con adición lenta del DNS para evitar precipitación. La solución enzimática se preparó mezclando 2.5 mg de la enzima β -fructofuranosidasa (Gist-Brocades con una actividad de 243 U/mg a 40°C) con 1.0 ml de amortiguador de citratos (0.32 M, pH 4.6). El procedimiento es como sigue: se tomó una alícuota de 1.0 ml del caldo de fermentación y se diluyó 1/25 con agua destilada y se sirvieron 0.9 ml en tubos de ensayo y se mezclaron con 0.1 ml de la solución enzimática. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos y posteriormente se adicionó 1.0 ml de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) a cada muestra. Los tubos se calentaron a ebullición durante 5 min e inmediatamente después se enfriaron en baño de hielo. A cada tubo se le adicionaron 10 ml de agua destilada y se leyó la absorbancia a 540 nm (espectrofotómetro Beckman DU 650) contra un blanco de reactivos. Los valores se extrapolaron en la curva patrón, la cual se elaboró utilizando soluciones de sacarosa en concentraciones de 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 g/l (Trujillo 1999). La ecuación de la curva estándar de sacarosa es la siguiente ($r^2=0.997$):

$$\text{Sacarosa [g/l]} = 2.031 \times \text{Abs}_{540} + 0.045$$

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4.2.4. Extracción y cuantificación de alginato

La técnica se basa en la precipitación del alginato con isopropanol y cuantificación gravimétrica del mismo (Jarman *et al.* 1978; Peña *et al.* 1997; Trujillo 1999). El procedimiento es como sigue: se mezclaron 10 ml de caldo de cultivo con 1 ml Na_2EDTA (0.1 M) y 1 ml de NaCl (1.0 M) y posteriormente se centrifugó a $15,500 \times g$ (centrífuga Eppendorf 5804) por 20 min. Se separó el sobrenadante y se mezcló con 30 ml de isopropanol, dejando reposar 10 minutos, para la precipitación del producto, centrifugándose nuevamente a $15,500 \times g$ por 20 min. El producto se filtró en membranas *Nucleopore* de 0.2 μm , los cuales se secaron a 70°C por 24 h (hasta peso constante). Finalmente, se pesó el filtro y se calculó (por diferencia de peso) la concentración de polisacárido en el medio.

4.2.5. Determinación de la viscosidad

La viscosidad del caldo de cultivo se midió en un viscosímetro de cono y plato (Wells-Brookfield LVT, Series 82198). Todas las determinaciones se hicieron a temperatura ambiente (25°C) a 6 rpm y usando el cono CP-52, lo cual corresponde (de acuerdo al fabricante) a una velocidad de deformación de 12 s^{-1} . Las medidas fueron realizadas de acuerdo a Peña *et al.* (1997), Peña (1998) y Miranda (1998).

4.2.6. Distribución de pesos moleculares

La distribución de pesos moleculares se determinó por cromatografía de filtración en gel (CFG) usando un par de columnas de Ultrahidrogel (UG 500 Waters y lineal Waters) de 7.8 mm (diámetro interno) por 300 mm, acopladas a un equipo de HPLC (Waters 625) con un detector de índice de refracción (Waters, 410). Como fase móvil se usó NaNO_3 0.1M a 35°C

a un flujo de 0.9 ml/min. La señal del detector fue procesada con un programa PC compatible (Maxima GPC, Waters, Mildford MA, USA). La calibración de las columnas se llevó a cabo con un método estándar de calibración utilizando pululanos de *Aureobasidium pullulans* como estándares de peso molecular con un intervalo de 5,800 a 1,600,000 Daltones (Peña *et al.* 1997). Para el análisis se inyectaron 50 µl de muestra (0.01 g de alginato disuelto en 10 ml de solución de nitrato de sodio 0.1 M y filtrada en membrana *Nucleopore* de 0.22 µm).

4.2.7. Cuantificación de la actividad alginato-liasa (alginasa) extracelular

Se desarrollaron tres técnicas para la determinación de la actividad liasa: a) seguimiento de actividad en cajas Petri (medio sólido), b) método espectrofotométrico a 235 nm y c) método cromatográfico.

4.2.7.1. Método en medio sólido

Este método es una modificación de la técnica previamente reportada por Gacesa y Wusteman (1990). La presencia de la actividad alginato-liasa se detectó mediante la inundación de cajas Petri con una solución al 10 % de cloruro de cetilpiridino ($C_{21}H_{38}NCl$). Éstas fueron previamente preparadas con la adición de una solución de agar (6 g/l) y alginato de alta viscosidad de *Macrocystis pyrifera* -Sigma Chemicals Co.- (1 g/l). En estas cajas se perforaron de 10 a 12 hoyos con un diámetro promedio de 2 mm y con una profundidad de 3 mm. En estos hoyos (con capacidad aproximada de 10 µl), se adiciona el sobrenadante del cultivo, previamente retirada la biomasa por centrifugación (15,500 x g) y retirado el alginato con una solución al 10 % de $CaCl_2$ (4°C por 4 h, y posterior centrifugación a 15,500 x g) y diálisis en solución de Tris-HCl (pH=7.2, 4°C, 12 h) para retirar el exceso de sales. Como blanco, se adicionó el sobrenadante del cultivo inactivado

por ebullición. Por otra parte, este método fue modificado con la intención de conocer la actividad de diferentes cepas de *A. vinelandii*. Se colocó en las cajas medio Burk modificado solidificado con agar (18 g/l) y alginato (1.0 g/l). En los pozos se inocularon las bacterias y se les permitió crecer por 72 h a 29°C. Posterior al crecimiento, los microorganismos son lavados con agua estéril y se prosigue a la tinción con cloruro de cetilpiridino. Cuando se presenta la formación de halos blancuzcos, son fotografiados utilizando un fondo negro.

4.2.7.2. Método espectrofotométrico

Los ácidos urónicos que son generados por la acción de las alginasas absorben fuertemente a 235 nm. Esta propiedad es utilizada para medir la actividad liasa (Ertesvåg *et al.* 1998). Se tomó una muestra de 10 ml del caldo de cultivo y se le adicionó 1 ml de EDTA (0.1 M) y 2 ml de NaCl (1.0 M) y se centrifugó a 15,500 x g durante 20 min. Al sobrenadante se le adicionaron 3 ml del cloruro de calcio (10 %) a 4°C por 3 h, el precipitado resultante fue eliminado por centrifugación (15,500 x g, 20 min). El sobrenadante fue dializado en Tris-HCl 0.02 M (pH 7.2), 1.5 ml del caldo de cultivo (sin células y alginato) obtenido como se presentó previamente, fue adicionado a 1.5 ml de una solución de alginato comercial de alta viscosidad de *M. pyrifera* (2.0 g/l) en *buffer* (50 mM) de Tris-HCl a un pH de 7.2. En una celda fue seguida la absorbancia a 235 nm por 10 min. La actividad específica se expresa como el cambio en absorbancia a 235 nm (ΔE_{235}) por minuto y por miligramo de proteína extracelular.

TESIS CON
FALLA DE CUBIERTA

4.2.7.2. Método cromatográfico

El método cromatográfico se basa en la utilización de la filtración en gel, para la determinación del peso molecular de un polímero. Se enfrentaron cantidades iguales (1.5 ml) de extracto proteico extracelular con alginato de alta viscosidad (*M. pyrifera*, Sigma, 1g/l). Al final de 20 h de incubación a temperatura controlada, se determina la caída en el peso molecular. Una unidad de actividad fue definida como la cantidad de enzima que degrada el peso molecular en 1.0 Dalton por hora. Este método de análisis se utilizó únicamente como método confirmativo de la caída del PMP del alginato.

4.2.8. Determinación de proteína extracelular

Se utilizó el método de Bradford usando el *kit* de Bio-Rad (California, USA). El azul de Coomassie se une primordialmente a aminoácidos básicos y aromáticos de una proteína especialmente a las argininas y lisinas. Este es un procedimiento simple y exacto para determinar la concentración de la proteína soluble. Implica la adición de un colorante ácido a la solución de la proteína y la medida a 595nm en un espectrofotómetro. La comparación en una curva patrón proporciona una medida relativa de la concentración de la proteína.

Inicialmente se reconstituyó el patrón liofilizado de albúmina bovina (siguiendo las instrucciones del proveedor), agregando 20 ml de agua desionizada a la proteína que viene en el *Kit* (solución final de 1.0 mg/ml). El reactivo se preparó diluyendo una parte del concentrado (Bio-Rad) con cuatro partes de agua destilada. En este trabajo se desarrollaron dos curvas patrón para diferentes niveles de concentración:

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En la primera curva patrón se prepararon cinco diluciones de la proteína estándar (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 mg/ml). Se tomaron 100 μ l de cada patrón o muestra, por triplicado y se le adicionaron 5.0 ml de la solución diluida. Se incubaron por 30 minutos y se leyó la absorbancia a 595 nm. La ecuación de la curva patrón es la siguiente ($r^2 = 0.995$):

$$\text{Proteína [mg/ml]} = 1.197 \times \text{Abs}_{235} - 0.034$$

Para la segunda curva patrón se empezó con una solución de 10 μ g/ml y se prepararon cinco diluciones (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 μ g/ml). Se tomaron 800 μ l de cada patrón o muestra por triplicado y se le adicionaron 200 μ l de la solución diluida. Se incubaron por 30 minutos y se leyó la absorbancia a 595 nm. La ecuación de la curva patrón es la siguiente ($r^2 = 0.992$):

$$\text{Proteína [\mu g/ml]} = 28.90 \times \text{Abs}_{235} - 0.31$$

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5. Estrategia experimental

La principal iniciativa que impulsó este proyecto se basó en que toda la literatura reportaba la cinética del PMP en cultivos a condiciones controladas bajo dos tendencias principales; un incremento del PMP durante toda la fase exponencial de crecimiento, obviamente causado por un fenómeno de polimerización del alginato y una caída hasta valores similares a los iniciales, que normalmente se presentaba al final de la fase exponencial de crecimiento (Peña *et al.* 2000; Trujillo-Roldán *et al.* 2001). Se había reportado que la enzima responsable de esta caída en el PMP era la alginato-liasa.

En consecuencia, el proyecto estaba dirigido a responder preguntas tales como: ¿El aumento del PMP del alginato en cultivo se debe a un fenómeno de polimerización?, ¿Cuando aumenta el PMP del alginato en cultivo, existe depolimerización?, ¿Existe relación de la cinética de actividad alginato liasa con los cambios en el PMP del alginato?, ¿Cuál es el papel de la polimerasa y la alginato liasa en la determinación del PMP?, ¿Existe un fenómeno de "dilución" del alginato en cultivo con el alginato pre-sintetizado en el inóculo?

Para entender el fenómeno de la polimerización y depolimerización, se realizó la eliminación de uno de los dos procesos; la depolimerización. Este proceso (la depolimerización) está regido por una enzima (AlgL). Con la colaboración del grupo de la Dra. Guadalupe Espín (Departamento de Microbiología Molecular, del Instituto de Biotecnología de la UNAM) se generó una mutante incapaz de producir alginato liasas, pero capaz de producir alginatos. Esta cepa presentó cinéticas de crecimiento y producción de

alginate muy similares a la cepa parental, pero incapaz de producir alginasas. Esta cepa mutante en *algL* se convirtió en la principal herramienta de este trabajo con el fin de entender el fenómeno de la polimerización.

Para eliminar el fenómeno de "dilución" del alginato en cultivo con el alginato pre-sintetizado en el inóculo, se propuso inocular únicamente las células. Esto se logró mediante la implementación de una sencilla estrategia metodológica: inocular al fermentador las células previamente centrifugadas y resuspendidas en nuevo medio de cultivo, asegurando que en el proceso de "limpieza" del inóculo no existiera lisis celular.

Con las herramientas previas (mutante incapaz de producir alginasa e inóculos lavados) ya era posible determinar el papel del complejo "polimerasa" en cultivo. Para esto se llevaron a cabo cultivos bajo condiciones controladas de oxígeno disuelto a 1, 3 y 5 % de TOD. Adicionalmente, se pudo comprender cómo la TOD regula los fenómenos de polimerización y depolimerización del alginato en cultivo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6. Resultados y discusión

Para poder determinar los papeles de la alginato liasa y el complejo polimerasa en la determinación del peso molecular del alginato por *Azotobacter vinelandii* y su relación con la tensión de oxígeno disuelto (TOD), es necesario entender cada proceso por separado.

El fenómeno de la polimerización del alginato por *A. vinelandii*, se presentaba en los cultivos como un aumento del PMP del alginato (Parente *et al.* 1998; Peña *et al.* 2000; Trujillo-Roldán *et al.* 2001), que finalizaba en la fase pre-estacionaria de crecimiento. En este proceso están involucradas (al menos) cuatro proteínas asociadas a la membrana interna de la bacteria (Alg8, Alg44, AlgX y AlgK) formando un complejo enzimático (Mejía-Ruiz *et al.* 1997a, 1997b; Sabra *et al.* 2001). Previo al proceso de polimerización está el proceso previo de síntesis del monómero activado (GDP-ácido manurónico), en el que están asociadas otras tres proteínas (AlgA, AlgC y AlgD) (Pindar y Bucke 1975; Campos *et al.* 1996, Espín 2002).

El fenómeno de la depolimerización del alginato, que se presenta al final de los cultivos (fase estacionaria) ocasionando la caída del PMP del alginato hasta valores cercanos a los del cultivo al inicio, está asociado a una única actividad enzimática (AlgL). Por otra parte, existía la posibilidad de que al menos dos epimerasas presenten actividad alginasa residual en cultivo, pues ya se había reportado esta actividad *in vitro* (Gacesa 1987; Svanem *et al.* 2001). Así, el generar una cepa mutante de *A. vinelandii* incapaz de producir alginasas se convirtió en la mejor posibilidad para comenzar a entender el

fenómeno de la polimerización / depolimerización. Trabajos previos en *P. aeruginosa* (May y Chakrabarty 1994), habían reportado que cepas mutantes que fallaran en la producción de alginasas (AlgL), siempre fructificaban en cepas no productoras de alginato (no mucoides). Los autores proponían que al menos para *P. aeruginosa*, la producción de alginatos estaba directamente relacionada con la actividad alginasa y su papel estaba estrechamente relacionado a la polimerización (May y Chakrabarty 1994).

En colaboración con el grupo de la Dra. Guadalupe Espín (Departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM) se generaron dos cepas mutantes de *A. vinelandii* incapaces de producir alginasas. Estas cepas fueron caracterizadas y se demostró que al menos una producía alginatos y serviría como una herramienta ideal para estudiar el fenómeno de la polimerización del alginato.

6.1. Caracterización de mutantes incapaces de producir alginasa

En *A. vinelandii*, el gen *algL* es el que codifica para la actividad alginato liasa y forma parte del operón *algGXLIVFA* (Vázquez *et al.* 1999). Estudios preliminares realizados en el grupo de la Dra. Espín habían demostrado que inserciones de casetes Ω en la misma orientación que la dirección de la transcripción produce mutaciones no-polares que permiten la transcripción de los genes que se encuentran cascada abajo del mismo operón (Mejía-Ruiz *et al.* 1997a; Vázquez *et al.* 1999). Se utilizaron los plásmidos pSML1 y pSML2 que tenían las mutaciones de carácter polar y no-polar *algL:: Ω Gm* y que no se replican en *A. vinelandii* (ver las construcciones en el anexo 1). Al realizarse la transformación en la cepa silvestre con estos plásmidos se obtuvieron 2 mutantes

resistentes a gentamicina: SML1 y SML2. La mutante SML1 no produjo alginato, observándose colonias no mucoides en crecimiento en medio sólido (figura 6.1.a), pues su mutación con carácter polar no permitía la transcripción de los genes corriente abajo del operón. La mutante SML2 sí permitió la producción del polímero, gracias a la mutación no-polar, con la producción de colonias mucoides similares a las de la cepa parental ATCC 9046 (figura 6.1.a). Mediante el método de detección de la actividad alginasa en medio sólido (ver Materiales y Métodos, sección 4.7.2.1), se pudo corroborar la existencia de la actividad en la cepa silvestre, pero no en las cepas mutantes.

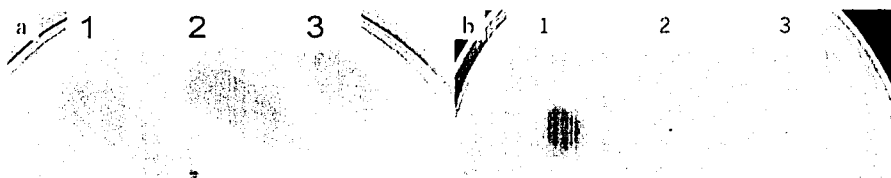


Figura 6.1. (a) Crecimiento en cajas Petri de la mutante no mucoide SML1 (1) y la mucoide SML2 (2) y de la cepa silvestre mucoide ATCC 9046 (3). (b) Determinación de la actividad alginato-liasa en medio sólido, después de lavado de las bacterias con agua destilada y tinción con cloruro de cetilpiridinio. ATCC 9046 (1), SML2 (2) y SML1 (3).

Ambas cepas mutantes y la silvestre fueron caracterizadas por fenotipo en crecimiento en medio sólido. Como se había observado anteriormente (figura 6.1.a), la mutante SML1 no producía alginato mientras que la mutante SML2 sí lo hacía (tabla 6.1). Por otra parte, el PMP del alginato producido en medio sólido fue mayor para la mutante SML2 (1263 kDa) que para la cepa silvestre (905 kDa). Ambos alginatos obtenidos tienen índices de polidispersión (IP) bajos (3.2 y 3.9; tabla 6.1), valores muy similares a los

reportados para alginatos comerciales provenientes de algas (con índices de polidispersión de 2.0 a 6.0, Peña *et al.* 1997).

Tabla 6.1. Producción de alginato en cultivos sólidos de las cepas de *A. vinelandii*.

Cepa	Alginato (mg/mg de proteína)	PMP (kDa)	IP
ATCC 9046	2.35 ± 0.32	905	3.2
SML1	0.021 ± 0.001	N.D.	N.D.
SML2	1.16 ± 0.32	1263	3.9

Estos resultados demostraron que la alginasa (AlgL) no está relacionada con la producción de alginatos de alto peso molecular. Por otra parte, y con el método en medio sólido, no se pudo cuantificar actividad alginasa residual. Aunque se han reportado dos epimerasas con actividad alginasa residual *in vitro* (Svanem *et al.* 2001; Ramstad *et al.* 2001). Estos resultados nos permitieron proponer que la única actividad alginasa importante en cultivos de *A. vinelandii* es la causada por AlgL.

Como se quería estudiar el fenómeno de la polimerización del alginato en *A. vinelandii* se seleccionó la cepa mutante SML2. Esta presentaba producción de alginato de alto peso molecular, sin la producción de la actividad alginasa. Una primera caracterización se realizó en fermentador, con el fin de evaluar los posibles efectos de la mutación en el crecimiento bacteriano y/o en la producción del polímero.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6.1.1. Caracterización de la mutante SML2 en matraces convencionales

La caracterización cinética (en matraces Erlenmeyer convencionales) de la mutante de *A. vinelandii* SML2 y su comparación con la cepa silvestre se presenta en la figura 6.2. El crecimiento bacteriano en los cultivos de la mutante SML2 fue muy similar al observado para la cepa silvestre, obteniéndose una velocidad de crecimiento de 0.11 h^{-1} para ambas cepas y concentraciones finales de biomasa de 3.4 g/l para la SML2 y de 3.6 g/l para la ATCC 9046 (figura 6.2.a). Por otro lado, la producción de alginato no se vió afectada por la mutación en SML2 (figura 6.2.b), con concentraciones finales de 6.6 y 6.4 g/l para las cepas SML2 y ATCC 9046, respectivamente. Los resultados de crecimiento de biomasa y de producción de alginato, indicaban que la mutación en *algL* aparentemente no afectaba el metabolismo de síntesis de alginato por la bacteria. Sin embargo, el consumo de la fuente de carbono fue más rápido en los cultivos realizados con la cepa mutante (figura 6.2.c).

La viscosidad del medio de cultivo fue mayor en los cultivos realizados con la cepa silvestre (figura 6.2.d) que en aquellos llevados a cabo con la cepa mutante SML2. Al final de los cultivos con la cepa silvestre se observó una caída en la viscosidad (desde 550 cps hasta 430 cps) alcanzando valores finales similares a los cultivos con la cepa mutante (410 cps).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

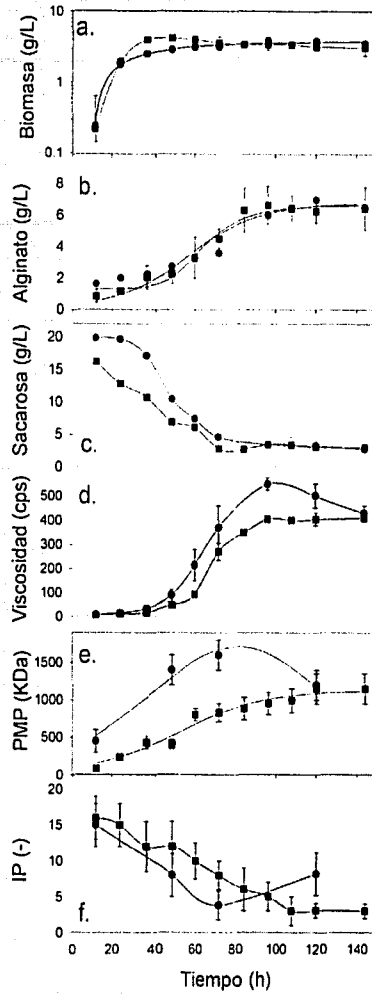


Figura 6.2. Cinéticas de crecimiento de biomasa (a), producción de alginato (b), consumo de sacarosa (c), viscosidad del caldo (d), peso molecular promedio (PMP) (e) e índice de polidispersión (IP) (f) de cultivos llevados a cabo con la cepa silvestre (●) y la mutante SML2 (■) en matraces convencionales. 200 rpm y sin control de TOD.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Al igual que el comportamiento presentado por la viscosidad, el PMP de los cultivos llevados a cabo con la cepa silvestre, siempre fue mayor que el PMP de los cultivos llevados a cabo con la cepa mutante. La cepa silvestre alcanza un PMP máximo de 1600 kDa; sin embargo, el alginato es depolimerizado, alcanzando valores al final del cultivo de 1200 kDa. Estos valores son muy similares al PMP obtenido con la cepa mutante SML2 (1150 kDa), pero con la diferencia de que éste alginato nunca fue depolimerizado, gracias a la naturaleza de la mutación en *algL*. El índice de polidispersión (IP) de las moléculas de alginato producido por ambas cepas, disminuye al aumentar el tiempo de cultivo, como un reflejo de la producción de alginatos de alto PMP. Sin embargo, al final de los cultivos llevados a cabo con la cepa silvestre, el IP aumenta como resultado de la depolimerización del alginato.

Los resultados de la evaluación de la cepa mutante SML2 en cultivos en matraces, permitieron proponer que la mutación en *algL* no estaba afectando el crecimiento bacteriano, ni la producción del polímero, al compararse con la cepa silvestre. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas en el consumo de fuente de carbono (ATCC 9046). Además se presentaron diferencias en la viscosidad de los caldos de cultivo, como consecuencia de las diferencias en PMP de los alginatos producidos por cada cepa.

Posteriormente, se propuso llevar a cabo la caracterización de la mutante en fermentador donde la TOD disuelto puede controlarse con precisión. Estos cultivos, se desarrollaron con el propósito de observar el fenómeno de aumento del PMP durante un

cultivo a condiciones controladas, usando la cepa mutante y compararla con la cepa silvestre para poder determinar qué otros factores podrían estar impactando la determinación del peso molecular del alginato.

6.1.2. Caracterización de la mutante SML2 en cultivo en fermentador

Peña *et al.* (2000) y Trujillo-Roldán *et al.* (2001) demostraron que pequeñas variaciones de la TOD (en el intervalo de 1 a 5 %) tenían efectos significativos en la producción del alginato y en su PMP. Además, Peña *et al.* (2000) demostraron que los mayores pesos moleculares promedio se obtenían a una velocidad baja de agitación (v.g. a 300 rpm, en un intervalo de 300 a 700 rpm). Así, la primera caracterización de las cepas SML2 y el ATCC 9046 fue llevada a cabo a una TOD de 3 % y a una velocidad de agitación de 300 rpm.

La figura 6.3.a presenta la cinética de crecimiento de biomasa. Se alcanzó una mayor concentración final de biomasa (7.0 g/l) en los cultivos llevados a cabo con la cepa mutante SML2 que con la cepa silvestre (3.8 g/l). Además, la cepa silvestre presentó una velocidad específica de crecimiento (μ) de 0.08 h^{-1} mientras que la cepa mutante creció más rápido, a una μ de 0.10 h^{-1} . Se obtuvo una concentración final de alginato de 2.6 g/l con la mutante SML2, una concentración más baja que la producida por la cepa silvestre de 4.0 g/l (figura 6.3.b). Además, la velocidad específica de producción de alginato (SAPR, por sus siglas en inglés) para SML2 ($0.011 \text{ galg/g}_{\text{biom}} \text{ h}$) fue más baja que la observada con la cepa silvestre ($0.026 \text{ galg/g}_{\text{biom}} \text{ h}$). La figura 6.3.c presenta el consumo de la fuente de carbono (sacarosa). En ambos cultivos, la sacarosa fue consumida totalmente. Para la cepa

silvestre, la velocidad específica de consumo de la fuente de carbono ($0.15 \text{ g}_{\text{sac}}/\text{g}_{\text{biom}} \text{ h}$) fue casi dos veces mayor que la encontrada para la cepa mutante SML2 ($0.08 \text{ g}_{\text{sac}}/\text{g}_{\text{biom}} \text{ h}$). Sin embargo, los rendimientos globales de alginato en base a la fuente de carbono ($Y_{P/S}$) fueron menores para los cultivos llevados a cabo con la cepa mutante ($0.14 \text{ g}_{\text{alg}}/\text{g}_{\text{sac}}$), que para aquellos llevados con la cepa silvestre ($0.17 \text{ g}_{\text{alg}}/\text{g}_{\text{sac}}$). Estos datos permiten proponer que la mutación en *algL* está afectando el metabolismo global de *A. vinelandii*, principalmente en la biosíntesis del alginato. Además, se pudo concluir que la cepa SML2 es una buena opción para producir alginatos de alto PMP y bajo IP (figuras 6.3.e y 6.3.f). Sin embargo, las menores concentraciones de alginato indican que la mutación en *algL* está jugando un papel importante en su producción. Esta discusión se llevará a cabo posteriormente.

En la figura 6.3.d se presenta la evolución de la viscosidad del medio de cultivo durante la fermentación. Se alcanzó una mayor viscosidad en los experimentos llevados a cabo con la cepa SML2 (60 cps) comparado con la cepa silvestre (15 cps). Como previamente se ha reportado, la viscosidad del medio de cultivo está directamente relacionada con el peso molecular del alginato (Clementi 1997). En la figura 6.3.e se presentan los resultados de cultivos llevados a cabo con la mutante SML2. Se obtuvo un PMP máximo de 1240 kDa (IP = 3.1), sin observarse depolimerización del alginato al final del cultivo. Por su parte, en los cultivos llevados a cabo con la cepa silvestre se obtuvieron PMP máximos de 680 kDa (IP = 3.5). Sin embargo, se observó una caída del PMP del alginato en la etapa estacionaria de cultivo. La depolimerización del alginato va desde un PMP de 680 kDa (IP = 3.5) hasta 500 kDa (con un IP de 5.2).

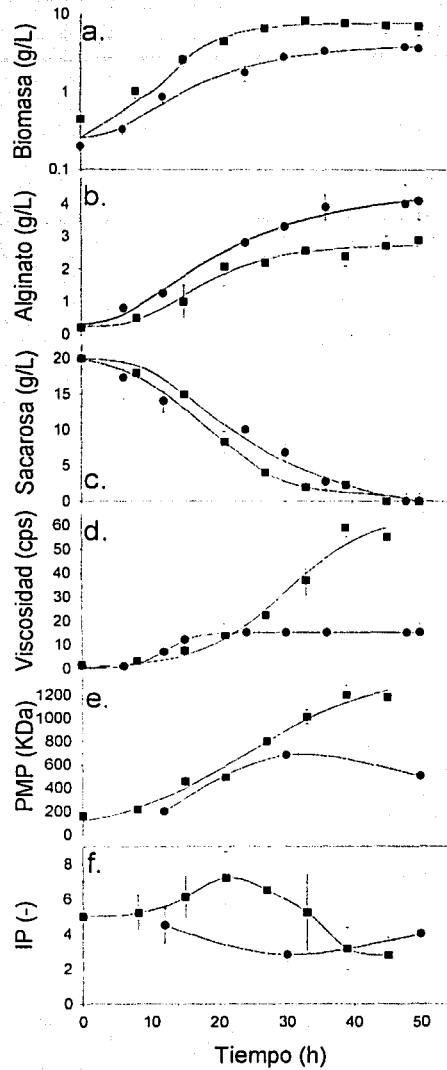


Figura 6.3. Cinéticas de crecimiento de biomasa (a), producción de alginato (b), consumo de sacarosa (c), viscosidad del caldo (d), peso molecular promedio (PMP) (e) e índice de polidispersión (IP) (f) de cultivos llevados a cabo a 3 % de TOD y 300 rpm usando la cepa silvestre (●) y la mutante SML2 (■).

Los perfiles de polimerización y depolimerización del alginato producido por la cepa silvestre (figura 6.3.e) han sido previamente reportados por Clementi *et al.* (1999) y Peña *et al.* (2000). Clementi *et al.* (1999) reportan que la polimerización del alginato, producido en fermentador, está asociada al crecimiento de la bacteria y la depolimerización del alginato se hace evidente cuando se detiene el crecimiento de la misma. Este fenómeno también ha sido reportado en nuestro grupo para el caso de cultivos llevados a cabo con la cepa silvestre ATCC 9046 (Peña *et al.* 2000; Trujillo-Roldán *et al.* 2001; Seáñez *et al.* 2001). Hasta este momento, se había demostrado que no existe depolimerización del alginato cuando se usa la mutante SML2 (figuras 6.2.e y 6.3.e), por lo que, se producen alginatos de alto PMP. Esta característica es interesante desde el punto de vista biotecnológico, ya que alginatos de alto peso molecular (con baja polidispersión) pueden llegar a ser de alto valor agregado (Ci *et al.* 1999; Wong *et al.* 2000). También se pudo demostrar que la alginasa (AlgL) no es esencial para la producción y polimerización del alginato. Por otro lado, May y Chakrabarty (1994) proponen que AlgL es esencial en la producción de alginato, al menos en *P. aeruginosa*. Los autores proponen a AlgL como una enzima “editora” del tamaño de la molécula y, sin la presencia de esta enzima, no podría iniciarse la polimerización de la molécula de alginato.

La mayor parte de los resultados de esta etapa del proyecto se publicaron en el artículo “Alginate production by an *Azotobacter vinelandii* mutant unable to produce alginate lyase”, M. A. Trujillo-Roldán, S. Moreno, D. Segura, E. Galindo y G. Espín, *Applied Microbiology and Biotechnology* 60:733–737 (2003). En ese artículo (incluido en el anexo) se presenta la construcción de las mutantes SML1 y SML2 y el efecto de la mutación de *algL* en la actividad alginasa. Se reporta que para ambas mutantes no se

encontró actividad enzimática de AlgL. Adicionalmente, se presentan las cinéticas de crecimiento, producción de alginato, viscosidad y PMP de los cultivos llevados a cabo a una TOD controlada de 3 % y una velocidad de agitación de 300 rpm con las cepas SML2 (productora de alginato) y la parental (ATCC 9046). Se realizaron algunos estudios sobre el efecto de la germinación de los quistes de *A. vinelandii*, ya que trabajos previos como los de Kennedy *et al.* (1992) habían sugerido que AlgL tenía un papel importante en la ruptura de la cápsula del quiste (compuesta principalmente de alginato) durante la germinación. Sin embargo, en este trabajo demostramos que la mutante SML2 y la cepa silvestre enquistaban y germinaban de manera muy similar, demostrando que una mutación no polar en *algL* no afectaba estos procesos celulares.

Posteriormente, se realizaron análisis del perfil de distribución de los pesos moleculares (cromatogramas) en los cultivos de la cepa mutante SML2 (a 3 % de TOD y 300 rpm), observándose que desde el momento de inoculación del cultivo (0 h), existía primordialmente una familia de bajo peso molecular, con un valor promedio de 200 - 250 kDa. A medida que transcurría el tiempo de cultivo se comenzaba a observar el incremento (16 h) de una segunda familia de altos pesos moleculares con un PMP de aproximadamente 1200 kDa (figura 6.4). Al final del cultivo (48 h) se obtuvo una familia con altos pesos moleculares (1250 kDa). Se concluyó que el alginato que provenía del inóculo y que era observado desde el inicio del cultivo, estaba afectando la determinación del PMP del alginato producido en el fermentador. Este efecto podría ser por un proceso de "dilución" de los alginatos de bajo PMP (producidos en el inóculo) sobre los de alto peso molecular producidos en el fermentador.

Los datos de los cromatogramas de los cultivos con la cepa SML2 (figura 6.4), nos demostraron que para entender el fenómeno de la polimerización del alginato en cultivos en fermentador bajo condiciones controladas de oxígeno disuelto, era necesario evitar el alginato que era sintetizado en el inóculo (matraz convencional). Si esto no se hacía, sería muy difícil poder diferenciar, de las distribuciones de peso molecular, cuál era el polímero que era sintetizado y cuál había sido inoculado al fermentador.

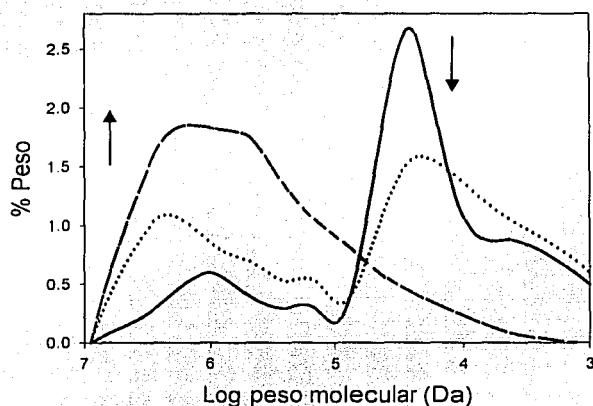


Figura 6.4. Distribuciones de peso molecular a diferentes tiempos de cultivo: 0 h (—); 16 h (···) y 48 h (- -), de los cultivos llevados a cabo a 3 % de TOD y 300 rpm usando la cepa SML2 de *A. vinelandii*.

El proceso típico de inoculación en cultivos de *A. vinelandii* consiste en la propagación de células en un pre-cultivo en un matraz convencional. Este volumen es equivalente al 10 % del volumen de trabajo del fermentador. Este inóculo se agrega en su

totalidad al nuevo medio de cultivo del biorreactor. Sin embargo, para entender la polimerización en cultivo, era necesario evitar la presencia de ciertos componentes del medio de cultivo agotado como el alginato y alginasas en el caso de la cepa silvestre (figura 6.4), y por ello se planteó una nueva metodología de inoculación que implicaba el uso de células lavadas.

6.2. El proceso de inoculación determina la cinética de los cultivos

El proceso convencional se llevó a cabo con la incubación de 100 ml de medio de cultivo con tres asadas de *A. vinelandii* por 24 h a 29°C en un matraz Erlenmeyer de 500 ml (Materiales y Métodos, sección 4.1). Este procedimiento ha sido rutinario en los trabajos de nuestro grupo (Peña *et al.* 1997; Peña *et al.* 2000; Trujillo-Roldán *et al.* 2001; Seáñez *et al.* 2001). El caldo completo, incluyendo las células, son inoculados en el biorreactor que contiene 900 ml de medio de cultivo fresco.

El nuevo procedimiento de inoculación consistió en la incubación de un matraz convencional de 500 ml con 100 ml de medio por 24 h a 29°C (Materiales y Métodos, sección 4.1). Posteriormente, las bacterias fueron centrifugadas en forma estéril (15500 x g, 10 min a 29°C) y resuspendidas de nuevo en 100 ml de medio de cultivo fresco. Esta suspensión fue inoculada en el biorreactor que contenía 900 ml de medio de cultivo fresco.

6.2.1 Comparación del proceso de inoculación utilizando la cepa silvestre ATCC 9046

La figura 6.5 presenta las cinéticas de los cultivos llevados a cabo con la cepa silvestre de *A. vinelandii*. Los cultivos reportados en esta sección se llevaron a cabo a 700

rpm y 3 % de TOD, ya que previamente se habían presentado como condiciones óptimas para la producción de alginatos (Trujillo 1999; Peña *et al.* 2000; Trujillo-Roldán *et al.* 2001). En la figura 6.5.a se puede observar cómo la cinética y la concentración final de biomasa de los cultivos inoculados convencionalmente (4.0 g/l), son similares a los cultivos llevados a cabo usando células lavadas (3.8 g/l). La velocidad específica de crecimiento (μ) de ambos cultivos también fue similar (0.21 y 0.20 h⁻¹, respectivamente). La figura 6.5.b presenta la cinética de producción de alginato de los cultivos. Se obtuvo una concentración final de alginato de 3.5 g/l en los cultivos llevados a cabo con células lavadas, 27 % menos alginato que lo obtenido en cultivos convencionalmente inoculados (4.8 g/l). El rendimiento de los cultivos convencionalmente inoculados (1.20 g_{alg}/g_{biom}) y la velocidad específica de producción de alginato (0.060 g_{alg}/g_{biom} h) son mayores que los valores obtenidos en los cultivos con células lavadas (1.16 g_{alg}/g_{biom} y 0.042 g_{alg}/g_{biom} h, respectivamente). Por otra parte, en todos los cultivos, la fuente de carbono (20 g/l) fue totalmente consumida. En la figura 6.5.c se observa que la viscosidad del caldo de los cultivos llevados a cabo con células lavadas era mayor (45 cps) que la viscosidad del caldo de los cultivos convencionalmente inoculados (7 cps). A su vez, se obtuvo un alginato de mayor PMP (1250 kDa) y de menor polidispersión (IP =6.0) en los cultivos inoculados con células lavadas (figuras 6.5.d y 6.5.e), respecto a los cultivos convencionalmente inoculados (350 kDa y IP de 8.2).

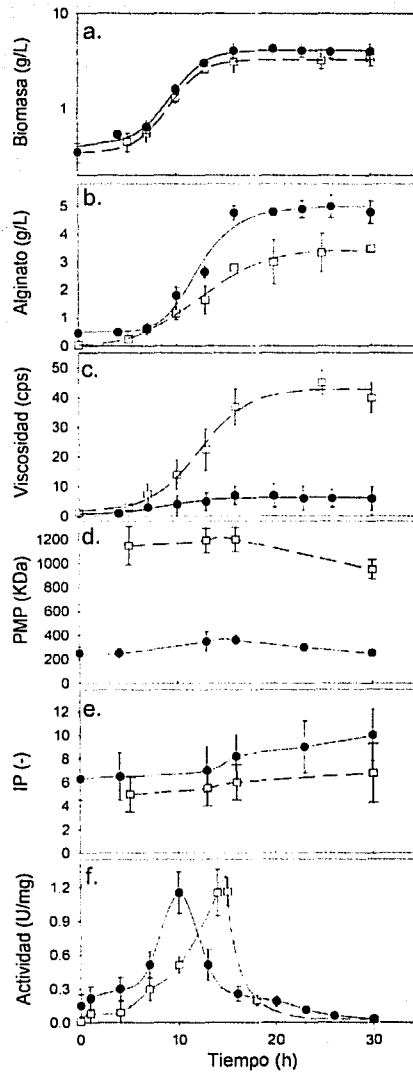


Figura 6.5. Cinéticas de crecimiento de *A. vinelandii* ATCC 9046 (a), producción de alginato (b), viscosidad del caldo (c), peso molecular promedio (PMP) (d), índice de polidispersión (IP) (e) y actividad específica alginasa (f) de cultivos inoculados convencionalmente (●) y con células lavadas (□) llevados a cabo a 3 % de TOD.

Al final de ambos cultivos se observó una caída en el PMP del alginato con un aumento del índice de polidispersión. En los cultivos llevados a cabo con células lavadas, la caída fue desde 1250 kDa (IP de 6.0) hasta 980 kDa (IP de 6.8). En los cultivos convencionalmente inoculados, la caída fue desde 350 (IP de 8.2) hasta 250 kDa (IP de 10). Además, como se presenta en la figura 6.5.f, en los cultivos convencionalmente inoculados, la actividad específica de la alginato liasa aumenta desde el inicio del cultivo. Esta actividad alcanza un máximo en la fase exponencial de crecimiento (1.15 U/mg). Más adelante, la actividad específica disminuye a valores similares a los del principio del cultivo. Por otra parte, cuando los cultivos fueron inoculados con células lavadas, la aparición de la actividad alginato-liasa se retrasó, alcanzando un máximo de 1.16 U/mg en la fase pre-estacionaria de crecimiento (figura 6.5.f). Las actividades volumétricas (no presentadas) mostraron siempre tendencias similares a las reportadas en este trabajo como actividades específicas.

En los cultivos inoculados convencionalmente, la presencia de la actividad alginato liasa desde el inicio del cultivo (figura 6.5.f) puede ser una de las razones del bajo peso molecular del alginato (250 kDa), además de que el máximo de actividad ocurre en franca fase exponencial de crecimiento, cuatro horas antes de que este máximo de actividad se presente en los cultivos inoculados con células lavadas. En los cultivos llevados con la cepa silvestre es muy probable que el alginato que está siendo sintetizado durante la fase exponencial de crecimiento, a su vez está siendo degradado por la actividad alginato liasa presente en el cultivo. Sin embargo, la caída en el PMP es sólo perceptible al final del

cultivo, posiblemente porque la relación de polimerización / depolimerización en la fase exponencial de crecimiento está a favor del aumento del peso molecular.

Al inicio de los cultivos inoculados convencionalmente existe una concentración de alginato de 0.45 g/l, con un PMP de 250 kDa y una actividad alginasa de 0.15 U/mg (figuras 6.5.b, 6.5.d y 6.5.f). Esta actividad alginasa y el alginato son sintetizados en el inóculo. Como se observa en la figura 6.5, la presencia de estos componentes está afectando las cinéticas de los cultivos. Sin embargo, los cambios observados en la producción de alginato (figura 6.5.b) y en el PMP (figura 6.5.d) no pueden ser explicados solamente por un fenómeno de dilución de los compuestos provenientes del inóculo. Por ejemplo, al final de los cultivos (30 h), aquellos inoculados convencionalmente producen 4.8 g/l de alginato, mientras que los inoculados con células lavadas sólo producen 3.5 g/l, haciendo una diferencia de 1.3 g/l. Esta diferencia es de casi tres veces la diferencia en la concentración de alginato al inicio de los cultivos (0.45 g/l). Por otra parte, las diferentes cinéticas de PMP (figura 6.5.d), consecuencia de las diferentes actividades de alginato liasa durante los cultivos (figura 6.5.f), sugieren que pequeñas cantidades de alginato y/o alginasa (como posiblemente otros componentes desconocidos y sintetizados en el inóculo) pudieran servir como señales que modifican la producción del polímero. Una posible explicación al mecanismo de acción de estos componentes del inóculo puede presentarse por medio de un sistema de regulación de dos componentes que está presente en *A. vinelandii* y que se ha demostrado que regula la biosíntesis del alginato y el crecimiento de la bacteria (Castañeda *et al.* 2000, 2001). El modelo propone que el sistema detecta señales ambientales (aún desconocidas) y activa -por un mecanismo de fosforilación-, el regulador

transcripcional GacA, el cual a su vez actúa sobre la expresión de otros genes (Heeb y Hass 2001). En *A. vinelandii*, la inactivación de uno de estos genes (*gacA* o *gacS*) resulta en un abatimiento de la transcripción de *algD* (Castañeda *et al.* 2000, 2001).

6.2.2. Comparación del proceso de inoculación utilizando la cepa mutante SML2

La figura 6.6 presenta las cinéticas de los cultivos inoculados convencionalmente y con células lavadas usando la cepa mutante SML2. Se obtuvo una concentración de biomasa de 5.0 g/l en los cultivos inoculados convencionalmente (figura 6.6.a), con una velocidad específica de crecimiento (μ) de 0.16 h^{-1} , mientras que en aquellos inoculados con células lavadas se obtuvo 3.9 g/l con una velocidad de crecimiento de 0.13 h^{-1} . Ambos cultivos, llevados a cabo con la cepa mutante presentaron velocidades específicas de crecimiento menores a las previamente presentadas con la cepa silvestre (0.20 y 0.21 h^{-1}).

La figura 6.6.b presenta cómo la concentración final de alginato es similar para ambos tipos de cultivo (3.2 g/l). Sin embargo, en este caso se produjo menor alginato que el obtenido en cualquiera de los cultivos llevados a cabo con la cepa silvestre. Adicionalmente, el rendimiento global ($Y_{P/X}$) y la producción específica de alginato de los cultivos inoculando células lavadas de la cepa SML2 ($0.85 \text{ g}_{\text{alg}}/\text{g}_{\text{biom}}$ y $0.038 \text{ g}_{\text{alg}}/\text{g}_{\text{biom}} \text{ h}$) fueron mayores a los de los cultivos inoculados convencionalmente ($0.62 \text{ g}_{\text{alg}}/\text{g}_{\text{biom}}$ y $0.028 \text{ g}_{\text{alg}}/\text{g}_{\text{biom}} \text{ h}$). En los cultivos llevados a cabo con la cepa SML2 no se observó diferencia significativa en la concentración final del alginato al comparar las formas de inoculación. En los cultivos llevados a cabo con la cepa silvestre se observó una disminución del 27 % en la concentración final de alginato, comparando los tipos de inoculación.

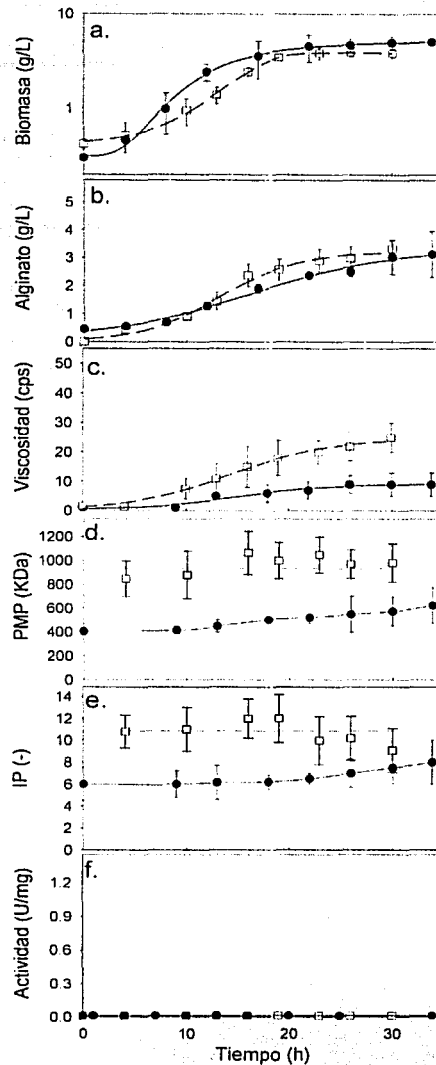


Figura 6.6. Cinéticas de crecimiento de *A. vinelandii* SML2 (a), producción de alginato (b), viscosidad del caldo (c), peso molecular promedio (PMP) (d), índice de polidispersión (e) y actividad específica alginasa (f) de cultivos inoculados convencionalmente (●) y con células lavadas (□) llevados a cabo a 700 rpm y a 3 % de TOD.

Los resultados indican que con la cepa SML2, la biosíntesis del alginato no se vio afectada por el retiro de los componentes del inóculo. Una posible explicación sería que la alginato liasa o alginatos de muy bajo peso molecular (residuos de una posible depolimerización por la alginasa y que son aquellos que no se producen en los cultivos con la cepa mutante) serían los efectores de la regulación del sistema de dos componentes.

Al igual que los cultivos llevados a cabo con la cepa silvestre, se alcanzó una mayor viscosidad (figura 6.6.c) en los cultivos inoculados con células lavadas (25 cps), mientras que en los cultivos convencionalmente inoculados, las viscosidades alcanzadas no fueron mayores de 9 cps. Las figuras 6.6.d y 6.6.e presentan la cinética del PMP y del IP. Se encontró un alginato de mayor PMP (1050 kDa) y mayor IP (10.0) en los cultivos inoculados con células lavadas, comparado con los cultivos inoculados en forma convencional (PMP de 625 kDa y IP de 8.0). Como era de esperar, en ambos tipos de cultivos, no se observó depolimerización del alginato al final del cultivo. Esto seguramente fue causado por la ausencia de actividad alginasa en los cultivos con la cepa mutante SML2 (figura 6.6.f).

Al inicio de los cultivos inoculados convencionalmente con la cepa SML2 existe una concentración promedio de alginato de 0.4 g/l con un PMP de 400 kDa (figuras 6.6.b y 6.6.d). Como se observa en la figura 6.6.d, este alginato inicial (del inóculo) sirvió para diluir lo que se produce en el fermentador y cambiar así el promedio del peso molecular. Al observar las distribuciones del peso molecular del alginato producido en los cultivos inoculados convencionalmente con la cepa mutante (figura 6.6.b), se pueden distinguir dos

familias de alginatos con diferentes PMP. Una familia corresponde al alginato proveniente del inóculo (MI, en la figura 6.7.b) con un PMP de 400 kDa y la segunda con un PMP de 1000 kDa que es similar al alginato producido en los cultivos inoculados con células lavadas (CICL, en la figura 6.7.b).

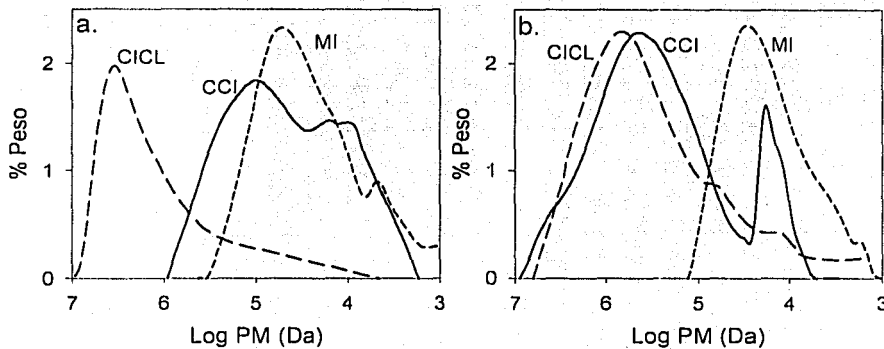


Figura 6.7. Distribuciones de peso molecular de alginatos producidos en el inóculo (*MI*), en los cultivos inoculados con células lavadas (*CICL*) y en los inoculados convencionalmente (*CCI*). Cultivos llevados a cabo con la cepa silvestre (a) y con la cepa mutante SML2 (b), a 3 % de TOD.

En la figura 6.7.a se presentan las distribuciones de peso molecular del alginato producido en los cultivos llevados a cabo con la cepa silvestre ATCC 9046. En este caso, se incluyen los datos de la distribución del PM del alginato proveniente del inóculo (*MI*) con un (PMP de 250 kDa) y de los cultivos inoculados con células lavadas (*CICL*) (con un PMP de 1250 kDa). A su vez, la figura 6.7.a presenta la distribución de los pesos moleculares del alginato producido en los cultivos inoculados convencionalmente (*CCI*). En la distribución de los *CCI* no se puede hacer una clara distinción entre los provenientes

del inóculo y los producidos durante el cultivo. Esto seguramente es causa de la actividad alginasa presente desde el inicio de los cultivos.

Parte de los resultados de esta sección, en particular aquellos cultivos llevados a cabo con la cepa silvestre ATCC 9046, se han incluido en el artículo: "Components in the inoculum determine the kinetics of *Azotobacter vinelandii* cultures and the molecular weight of the alginate", Mauricio A. Trujillo-Roldán, Carlos Peña y Enrique Galindo *Biotechnology Letters* 25:1251-1254 (2003). En este artículo (incluido en el anexo) se postula que los componentes del medio agotado del caldo del inóculo juegan un papel regulador muy importante en la biosíntesis del alginato. Además, en este artículo se destaca que para una interpretación detallada y relevante de la biosíntesis de alginato por *A. vinelandii* debe tenerse muy presente el efecto de éstos componentes, particularmente en un fenómeno tan complejo como la polimerización y depolimerización del alginato.

Los cultivos llevados a cabo con células lavadas de ambas cepas, mostraron que el perfil de aumento del PMP del alginato durante la fase exponencial de crecimiento, previamente reportado (Peña *et al.* 2000; Trujillo-Roldán *et al.* 2001) ya no se presentaba. Las figuras 6.5.d y 6.6.d indicaban que durante la fase exponencial de crecimiento, el PMP era similar durante todo el cultivo, cayendo únicamente en la fase estacionaria en los cultivos con la cepa silvestre. Estos resultados permitieron proponer que el papel de la polimerasa de *A. vinelandii* era siempre el mismo: fabricar alginatos de un único tamaño molecular. También se propuso que este mecanismo de acción de la polimerasa, estaba determinado importantemente por la TOD.

6.3. El papel de la TOD en el desempeño del complejo polimerasa y la alginasa en la determinación del peso molecular del alginato

Al analizar las cinéticas de los cultivos inoculados con células lavadas de las cepas silvestre y la mutante SML2, se puede concluir que la velocidad específica de crecimiento (μ) de los cultivos llevados a cabo con la cepa mutante SML2 (0.16 h^{-1}) es menor que la μ de los cultivos con la cepa silvestre (0.19 h^{-1}). Sin embargo, en ambos cultivos se alcanzó una concentración final de biomasa similar (3.4 y 3.6 g/l, para ATCC 9046 y SML2, respectivamente, figura 6.8.a). La figura 6.8.b presenta la evolución de la concentración de alginato durante el curso de los cultivos. Se obtuvo una concentración final de alginato similar para ambas cepas (3.5 y 3.3 g/l para ATCC 9046 y SML2, respectivamente). Sin embargo, la velocidad específica de producción de alginato (SAPR) fue estadísticamente mayor para la cepa silvestre ($0.06 \text{ galg/g}_{\text{biom}} \text{ h}$) que para la cepa mutante ($0.05 \text{ galg/g}_{\text{biom}} \text{ h}$).

En la figura 6.8.c se observa un PMP mayor y constante (kDa 1250) en los cultivos llevados a cabo con la cepa silvestre. Con la cepa SML2, se obtuvo un alginato de un PMP de 985 kDa, también constante durante todo el cultivo. Sin embargo, después de 14 h del cultivo con la cepa silvestre (fase pre-estacionaria de crecimiento), el alginato comienza a ser depolimerizado por la acción de la actividad alginasa (figura 6.8.e) y se presenta una caída del PMP de 1250 a 980 kDa (figura 6.8.c). En los cultivos llevados a cabo con la cepa mutante, no se observó depolimerización del alginato (figura 6.8.c) y no se detectó actividad alginasa (figura 6.8.e). Por su parte, la figura 6.8.d presenta el índice de polidispersión de las moléculas de alginato producido por ambas cepas, siendo mayor el del alginato obtenido en los cultivos usando la cepa mutante.

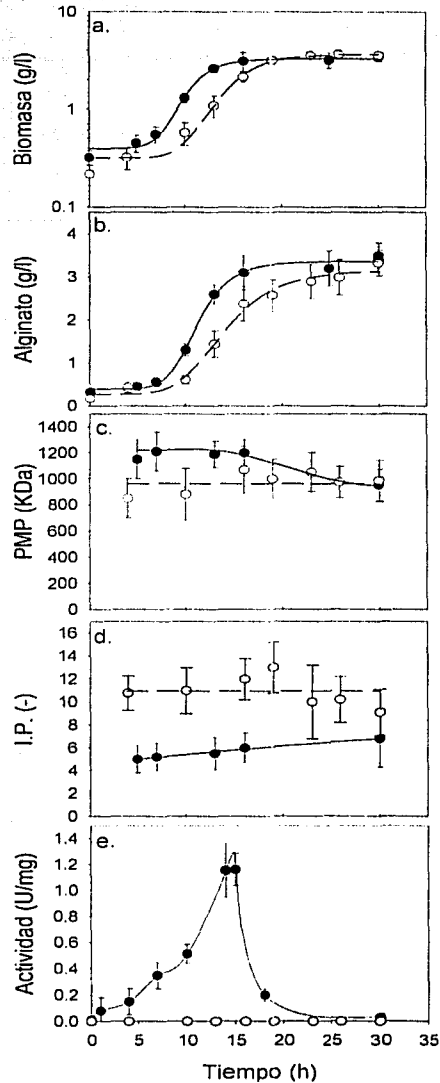


Figura 6.8. Cinética de crecimiento de biomasa (a), concentración de alginato (b), peso molecular promedio (c), índice de polidispersión (d) y actividad específica alginasa (e) de cultivos inoculados con células lavadas de *A. vinelandii* ATCC 9046 (●) y SML2 (○) llevados a cabo a 700 rpm y 3 % de TOD.

El comportamiento cinético de los cultivos llevados a cabo a 1 y 5 % de TOD, usando ambas cepas fue similar al previamente descrito para los cultivos llevados a cabo a 3 % de TOD (figuras 6.9 y 6.10). Como se presenta en las figuras 6.8.e, 6.9.e y 6.10.e, la actividad específica de la alginasa de los cultivos llevados a cabo con la cepa silvestre, aumenta con el tiempo de cultivo, alcanzando su máximo de actividad específica al fin de la fase exponencial de crecimiento (0.75 U/mg para 1 %, 1.15 U/mg para 3 % y 0.32 U/mg para 5 % de TOD). Posteriormente, la actividad específica alginasa disminuyó a valores similares a los del principio del cultivo. Por otra parte, cuando los cultivos fueron llevados a cabo con la mutante SML2, no se detectó actividad alginasa (figuras 6.8.e, 6.9.e y 6.10.e).

La figura 6.11 presenta un resumen de los cultivos llevados a cabo a diferentes condiciones de TOD y presentados en las figuras 6.8, 6.9 y 6.10 usando ambas cepas. La concentración máxima de la biomasa fue obtenida a 1 % de TOD (figura 6.11.a) para ambas cepas (6.9 ± 1.2 g/l y 5.7 ± 1.2 g/l, para ATCC 9046 y SML2, respectivamente). A 3 % y 5 % de TOD, las concentraciones finales de biomasa fueron similares para ambas cepas y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los datos (alrededor 3.5 ± 0.3 g/l). La figura 6.11.b indica que para los cultivos llevados a cabo con la cepa SML2, independientemente del nivel del TOD (en el intervalo de 1 a 5 %), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones finales de alginato (3.5 ± 0.4 g/l). Este comportamiento fue diferente al observado con los cultivos de la cepa silvestre donde la producción del polímero depende de la TOD. Concentraciones finales de alginato de 2.8 ± 0.2 , 3.5 ± 0.3 , y 3.2 ± 0.2 g/l fueron obtenidas para TOD de 1, 3 y 5 %, respectivamente.

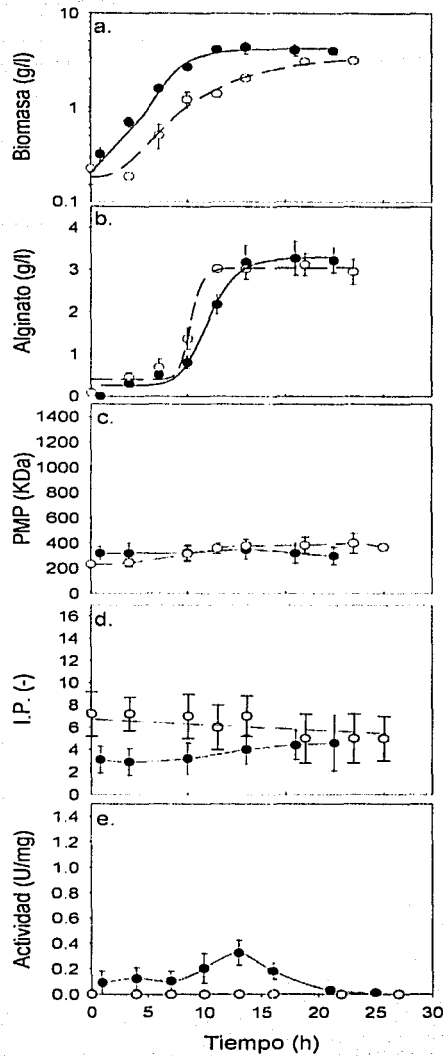


Figura 6.9. Cinética de crecimiento de biomasa (a), concentración de alginato (b), peso molecular promedio (PMP) (c), índice de polidispersión (IP) (d) y actividad específica alginasa (e) de cultivos inoculados con células lavadas de *A. vinelandii* ATCC 9046 (●) y SML2 (○) llevados a cabo a 700 rpm y a 5 % de TOD.

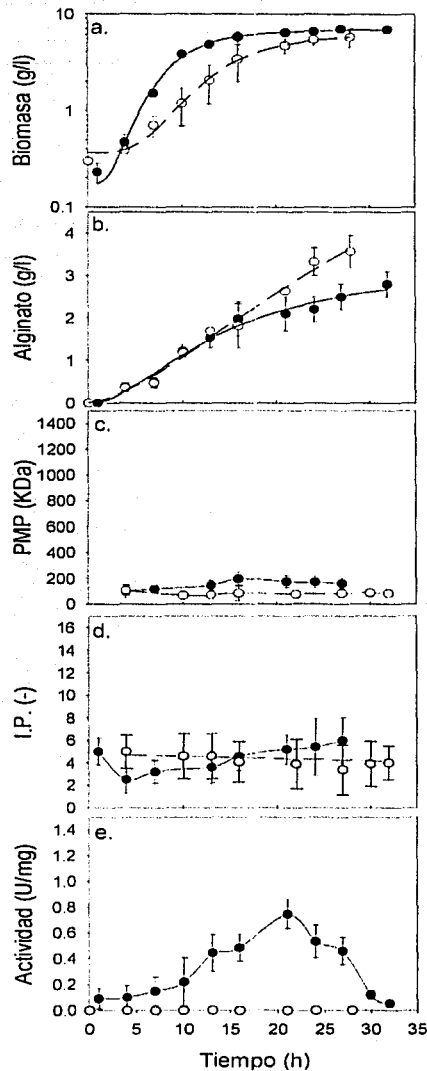


Figura 6.10. Cinética de crecimiento de biomasa (a), concentración de alginato (b), peso molecular promedio (PMP) (c), índice de polidispersión (IP) (d) y actividad específica alginasa (e) de cultivos inoculados con células lavadas de *A. vinelandii* ATCC 9046 (●) y SML2 (○) llevados a cabo a 700 rpm y a 1 % de TOD.

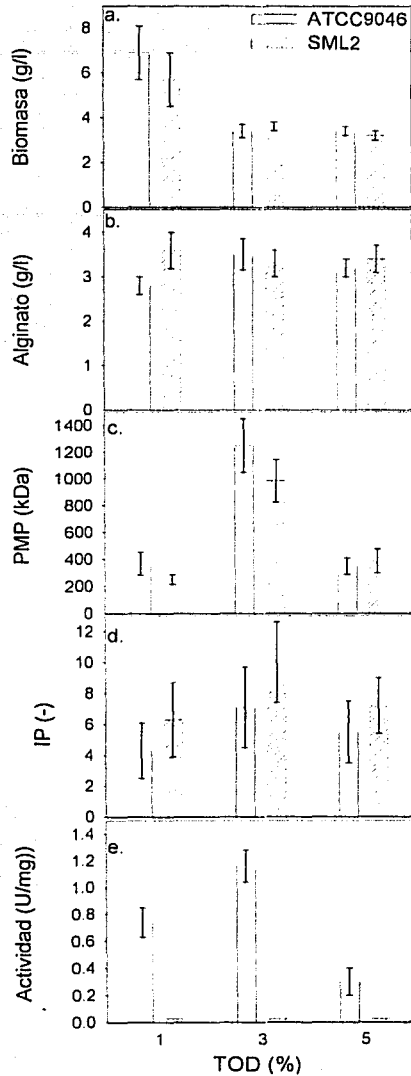


Figure 6.11. Efecto de TOD sobre la biomasa final (a), alginato final (b), peso molecular promedio máximo (PMP) (c) y el índice de polidispersión (IP) (d) del alginato y la actividad específica máxima alginasa (e) en los cultivos inoculados con células lavadas de SML2 y ATCC 9046.

En la figura 6.11.c se presenta cómo la TOD afecta el peso molecular promedio del alginato producido en los cultivos llevados a cabo con las cepas ATCC 9046 y SML2. Para la cepa silvestre, los valores del PMP son aquellos obtenidos antes de que el PMP del alginato comience a disminuir. Para ambas cepas, el PMP más alto fue alcanzado a 3 % de oxígeno disuelto, donde se obtuvieron valores promedio de peso molecular de 1250 y 985 kDa, para ATCC 9046 y SML2, respectivamente. En la figura 6.11.d se observa que no existen diferencias significativas entre el índice de polidispersión de los alginatos obtenidos en los cultivos llevados a cabo con la cepa ATCC 9046 y con la mutante SML2 para 1 y 5% de TOD.

La figura 6.11 indica que la actividad específica máxima de la alginato liasa se presenta en cultivos a 3 % de TOD. En los cultivos con la cepa silvestre, el máximo de esta actividad fue encontrado en la fase pre-estacionaria de crecimiento (como se presenta en las figuras 6.8.c, 6.9.c y 6.10.c). Por otra parte, no se detectó actividad alginato liasa en los cultivos llevados a cabo con la mutante SML2 (figura 6.11.e).

La figura 6.12 presenta un resumen del efecto de la TOD sobre los parámetros cinéticos de los cultivos inoculados con células lavadas de la cepa silvestre y la mutante SML2. La figura 6.12.a resume el efecto de la TOD sobre la velocidad específica de crecimiento (μ). Se observó una menor μ para todos los cultivos llevados a cabo con la cepa mutante bajo todas las condiciones de oxígeno disuelto evaluadas. Por otra parte, los

rendimientos globales de producto sobre biomasa y las velocidades específicas de producción de alginatos presentan un máximo a 3 % de TOD para la cepa silvestre, con un comportamiento similar a lo previamente reportado en nuestro grupo (Trujillo 1999; Peña *et al.* 2000; Trujillo-Roldán *et al.* 2001). Sin embargo, para la cepa mutante SML2, los mayores rendimientos globales ($Y_{P/X}$) y velocidades específicas de producción de alginato se presentaron a 5 % de TOD (figura 6.12.b y 6.12.c). Por otra parte, la velocidad específica de consumo de fuente de carbono presenta el mismo comportamiento reportado previamente para los cultivos inoculados convencionalmente (Peña *et al.* 2000; Trujillo-Roldán *et al.* 2001), donde la máxima velocidad de consumo se presenta a 5 % de TOD para ambas cepas.

Como se había discutido previamente, *A. vinelandii* aparentemente sintetizaba alginatos con un mismo PMP e IP (figuras 6.8, 6.9 y 6.10) bajo condiciones controladas de oxígeno disuelto y utilizando células lavadas como inóculo. La figura 6.13 presenta las distribuciones del peso molecular (DPM) de los alginatos producidos en diversos tiempos de cultivo. Estos cultivos son llevados a cabo usando la cepa silvestre y la mutante a diferentes condiciones de TOD (1, 3 y 5 %). Las figuras 6.13.a, 6.13.b y 6.13.c presentan cómo en los cultivos llevados a cabo con la mutante SML2 se sintetiza una única familia de alginatos (para cada TOD evaluada) durante todo el cultivo, sin ser este alginato depolimerizado.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

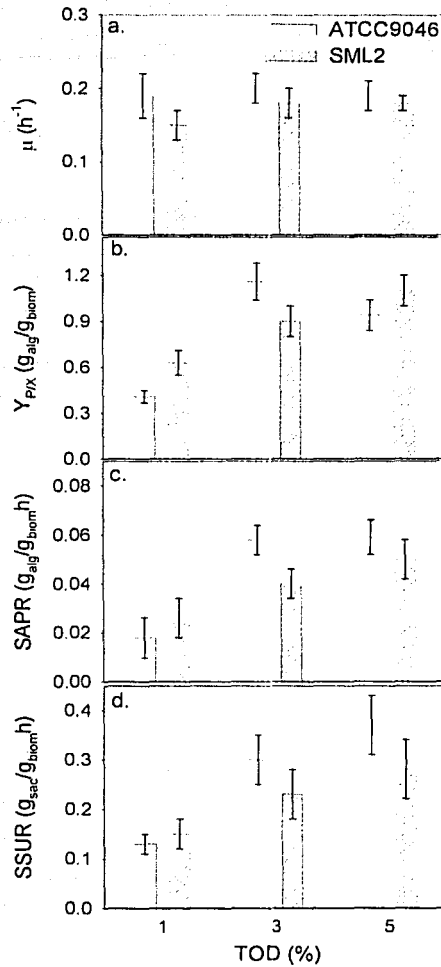


Figure 6.12. Efecto de TOD sobre la velocidad específica de crecimiento (μ) (a), rendimiento de alginato sobre biomasa (Y_{PX}) (b), velocidad específica de producción de alginato (SAPR) (c) y velocidad específica de consumo de sacarosa (SSUR) (d) en los cultivos inoculados con células lavadas de SML2 y ATCC 9046.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En los cultivos llevados a cabo con la cepa silvestre, se observó también la síntesis de una única familias de alginatos a lo largo de los cultivos con una distribución de peso molecular (DPM) similar, para cada TOD evaluada (figuras 6.13.d, 6.13.e y 6.13.f). Sin embargo, hacia el final del cultivo, se hizo evidente un ligero movimiento a la derecha de la distribución de los pesos moleculares (evidencia de una caída en el PMP). Esto es causado por la depolimerización del alginato debido a la acción de la alginato liasa. Este fenómeno se hace evidente al fin de la fase exponencial de crecimiento, cuando la actividad alginasa es máxima.

Los resultados de la figura 6.13 permiten proponer que mientras las células estén en condiciones controladas de cultivo (en especial la TOD), *A. vinelandii* va a sintetizar alginatos del mismo tamaño molecular. Este mecanismo de síntesis del polímero, está relacionado a la actividad de las enzimas previas en el metabolismo (AlgA, AlgC y AlgD). Horan *et al.* (1983) demostró que la actividad de estas tres enzimas está fuertemente relacionada con la TOD.

Es posible que, la transcripción de los genes *alg8*, *alg44*, *algX* o *algK* (como partes del complejo polimerasa) fueran afectados por la TOD como sucede para la transcripción de *algA*, *algC* y *algD* en *P. aeruginosa* (Leitão y Sá-Correia 1997). También, puede ser posible que la actividad de las enzimas que conforman el complejo polimerasa esté siendo afectado por la TOD de manera similar como se demostró para AlgA, AlgC y AlgD en *P.*

aeruginosa (Leitão y Sá-Correia 1993) o para las mismas enzimas en *A. vinelandii* (Horan *et al.* 1983).

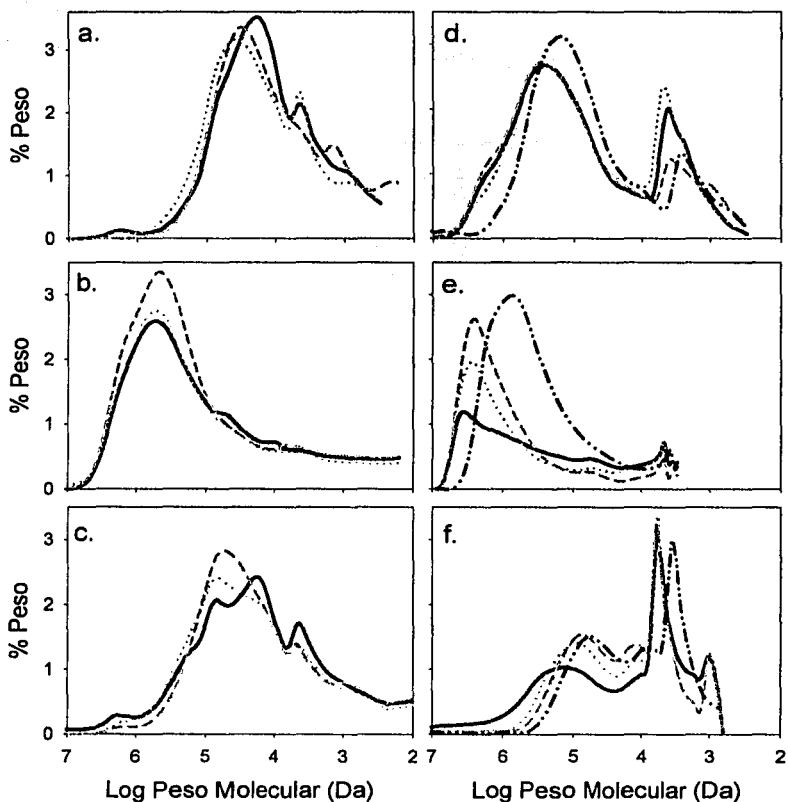


Figura 6.13. Izquierda: distribuciones del peso molecular del alginato producido por *A. vinelandii* SML2 en cultivos llevados a cabo a (a) 1 % TOD: (—) 7 h, (• •) 13 h, (- -) 21 h. (b) 3 % TOD: (—) 7 h, (• •) 13 h, (- -) 16 h. (c) 5 % TOD: (—) 7 h, (• •) 13 h, (- -) 16 h. Derecha: distribuciones del peso molecular del alginato producido por *A. vinelandii* ATCC 9046 en cultivos llevados a cabo a (d) 1 % TOD: (—) 10 h, (• •) 13 h, (- -) 25 h, (-• •-) 30 h. (e) 3 % TOD: (—) 6 h, (• •) 10 h, (- -) 16 h, (-• •-) 25 h. (f) 5 % TOD: (—) 6 h, (• •) 10 h, (- -) 16 h, (-• •-) 25 h.

Las diferencias significativas al comparar las cinéticas de crecimiento y producción de alginatos de la cepa silvestre con la cepa mutante (presentadas en forma resumida en las figuras 6.10 y 6.11), pueden ser explicadas por la forma como fue construida la mutante SML2. Es decir, se había demostrado que la inserción de un casete Ω en forma no-polar en un gen (específicamente *algF*) perteneciente al grupo de genes biosintéticos *algXLIVFA* reducía la producción del alginato (Vazquez *et al.* 1999). El mismo comportamiento se observó en la mutante SML2 donde el casete Ω en forma no-polar fue insertado en *algL* (sección 6.1, tabla 6.1, figuras 6.3 y 6.11). La transcripción de los genes corriente abajo de *algL* (*algI*, *algV*, *algF* y *algA*) ya no está siendo regulada por el propio promotor dentro del operón biosintético de alginato, sino por el promotor del casete. Si por alguna razón, el promotor del casete es más débil que el propio promotor del operón *algXLIVFA*, la transcripción de *algA* se estaría llevando a cabo de una manera menos eficiente, afectando la actividad enzimática del primer y tercer paso en la biosíntesis del alginato (ambos llevados a cabo por AlgA). Una relación entre la disminución de la transcripción de *algA* y la disminución de la producción de alginato por una menor actividad de AlgA ha sido demostrada previamente en *P. aeruginosa* por (Leitão y Sá-Correia 1997). Por otra parte, la figura 6.11.c demuestra como el peso molecular máximo del alginato obtenido por la cepa silvestre (previo a la depolimerización) que es mayor al de la cepa mutante. Es posible que la disminución de la transcripción de *algA* esté afectando los pasos posteriores de la biosíntesis del alginato, como la actividad de AlgD y del complejo polimerasa.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En los cultivos llevados a cabo con la cepa silvestre (para una TOD específica), las distribuciones de peso molecular fueron siempre muy similares (figuras 6.13.d, 6.13.e, y

6.13.f). Sin embargo, después de la fase pre-estacionaria se presentó la depolimerización del alginato, evidente por el movimiento de las familias de alginato hacia un PMP más bajo. Cuanto más alta es la actividad específica alginasa (figura 6.11.e), mayor es la caída del PMP del alginato (figuras 6.13.d, 6.13.e y 6.13.f). Bajo 1 % TOD, la caída del PMP (Δ MMW) fue de 370 hasta 280 kDa (Δ MMW = 90 kDa), con una actividad específica máxima alginasa de 0.75 U/mg. A 3 % TOD, la caída del PMP fue de 1250 a 985 kDa (Δ MMW = 265 kDa), con una actividad enzimática específica máxima de 1.16 U/mg. Finalmente, a 5 % de TOD, la caída del PMP es de 350 hasta 300 kDa (Δ MMW = 50 kDa) con una actividad enzimática máxima de 0.30 U/mg. Estas caídas del PMP fueron medidas en un periodo de 10 h, desde el momento del fin de la fase exponencial de crecimiento para cada cultivo. Se encontró que la caída del PMP de los alginatos en los cultivos inoculados con la cepa silvestre, es una función de la actividad específica máxima alginasa (figura 6.11.e), por medio la siguiente relación:

$$\Delta\text{PMP} = 213.8 \text{ A.E.} - 16.9$$

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

donde el Δ PMP es la caída del peso molecular (en kDa) en la fase estacionaria de los cultivos llevados a cabo con la cepa silvestre (10 h) y A.E. es la actividad específica máxima alginasa (U/mg) encontrada en el fin de la fase exponencial de crecimiento. Estos resultados permiten proponer que la alginato liasa (AlgL) es la única enzima encargada de la depolimerización del alginato, en un proceso posterior a la producción y polimerización. Otras proteínas con actividad alginasa reportada (al menos *in vitro*) como las epimerasas AlgE2 y AlgE7 (Gacesa 1987; Svanem *et al.* 1999; Svanem *et al.* 2001) no desempeñan

papeles importantes en la depolimerización en cultivo. En este trabajo, en los cultivos llevados a cabo con la cepa mutante SML2, no se encontraron actividades alginasas extracelulares residuales.

May and Chakrabarty (1994) proponen que la alginasa funciona como una proteína de edición que controla la longitud de las cadenas del polímero. Además, estos autores proponen que la alginasa funciona como una proteína de corte que provee al complejo polimerasa de pequeños oligómeros para iniciar la reacción de polimerización. En este estudio hemos demostrado que una mutante de *A. vinelandii* que carece de la actividad alginasa puede producir alginato, con características moleculares (distribución y peso molecular promedio) muy similares a los alginatos obtenidos en la cepa silvestre de *A. vinelandii*. Así, estos resultados demuestran que la alginato liasa no es necesaria para iniciar la polimerización o para producir alginato. Además, se propone que dicha actividad está restringida únicamente a pasos de post-polimerización, modificando finalmente el peso molecular del polímero.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La mayor parte de los resultados de esta sección han sido incluidos en el artículo: "The roles of oxygen and alginate-lyase in determining the molecular weight of alginate produced by *Azotobacter vinelandii*", Mauricio A. Trujillo-Roldán, Soledad Moreno, Guadalupe Espín and Enrique Galindo, *Applied Microbiology and Biotechnology*, en prensa (2003) (el cual puede ser consultado en el anexo). En este artículo se describe a la mutante SML2 como una importante herramienta para establecer el papel del complejo polimerasa en cultivo y de la metodología de inocular los fermentadores con células

lavadas como la mejor manera de observar los efectos del oxígeno disuelto sobre los perfiles de polimerización. Así, este artículo, incorporando los resultados de los dos artículos previos describe cuáles son los papeles del oxígeno disuelto y la alginasa en la determinación del peso molecular del alginato por *A. vinelandii*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

7. Conclusiones

- En todos los cultivos llevados a cabo con la cepa mutante no-polar en *algL* (SML2) no existe depolimerización del alginato, pero sí producción del polímero. Además, no se detectó actividad alginasa residual. Estos resultados proponen que la actividad alginasa es la principal causa de la caída del peso molecular promedio del alginato producido en cultivo por *A. vinelandii*.
- A diferencia de lo que se ha reportado para otros microorganismos, se demostró que en *A. vinelandii* la actividad alginasa no participa en la biosíntesis del polímero.
- En los cultivos inoculados con células lavadas se obtuvieron alginatos de altos pesos moleculares promedio (y menos polidispersos), comparado con los cultivos convencionalmente inoculados. Esto indica que los componentes que provienen del inóculo (como son el alginato, la alginasa y posiblemente otros desconocidos) juegan papeles muy importantes en la determinación del peso molecular del alginato por *A. vinelandii*.
- Se presentaron diferencias en las cinéticas de crecimiento bacterial y producción de alginatos entre los cultivos inoculados con células lavadas de la cepa silvestre y los cultivos convencionalmente inoculados. Estas diferencias pueden ser resultado de la ausencia (o presencia) de los componentes pre-sintetizados en el inóculo.
- La actividad alginasa y el alginato de bajo peso molecular provenientes del inóculo (además de otros compuestos aún desconocidos) podrían ser los componentes efectores de la regulación de la biosíntesis del alginato.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- En los cultivos inoculados con células lavadas de la cepa mutante SML2 se sintetizaron familias de polímeros de distribuciones de peso molecular (DPM) similares, de baja polidispersión y alto PMP. Se propone que el papel del complejo polimerasa en *A. vinelandii* está determinado por la fabricación de alginatos de la misma talla molecular. Además, la alginasa no estaría relacionada en la determinación del peso molecular (al menos en el proceso de polimerización).
- En cultivos inoculados con células lavadas de la cepa mutante silvestre de *A. vinelandii* se observó un comportamiento similar al de la cepa mutante: síntesis de familias de polímeros de DPM similares. Sin embargo, al final de la fase exponencial se observó la caída del PMP. Se propone que el papel de la alginasa en la determinación del PMP del polímero está restringido a un proceso extracelular de post-polimerización.
- Los procesos de polimerización y depolimerización del alginato están fuertemente determinados por la tensión de oxígeno disuelto (TOD), de manera similar a lo previamente reportado para otras enzimas claves de la biosíntesis del alginato, que presentan actividades máximas a valores intermedios de TOD (2 – 5%).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

8. Bibliografía

- Anninon G, Couperwhite L (1986) Effect of limiting substrate concentration, growth rate and aeration on alginate composition and production by *Azotobacter vinelandii* in continuous culture. *Food Hydrocolloids* 1: 101-111
- Boswell C. (2002) Producers seek price increases in the nature alginates market. *Chem Market Reporter* 262(18): 10-11
- Brivonese AC, Sutherland IW (1989) Polymer production by a mucoid strain of *Azotobacter vinelandii* in batch culture. *Appl Microbiol Biotechnol* 30: 97-102
- Brown BJ, Preston JF 3rd (1991) L-guluronan-specific alginate lyase from a marine bacterium associated with *Sargassum*. *Carbohydr Res* 211(1): 91-102
- Campos ME, Martínez-Salazar JM, Lloret L, Moreno S, Núñez C, Espín G, Soberón-Chávez G (1996) Characterization of the gene coding for GDP-mannose dehydrogenase (*algD*) from *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol* 178: 1793-1799
- Castañeda M, Guzman J, Moreno S, Espin G (2000) The GacS sensor kinase regulates alginate and poly- β -hydroxybutyrate production in *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol* 182: 2624-2628.
- Castañeda M, Sanchez J, Moreno S, Nunez C, Espín G (2001) The global regulators GacA and σ^S form part of a cascade that controls alginate production in *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol* 183: 6787-6793
- Chen GC, Page WJ (1997) Production of poly- β -hidroxybutyrate by *Azotobacter vinelandii* in a two-stage fermentation process. *Biotechnol Techniques* 11: 347-350
- Chen WP, Chen JY, Chang SC, Su CL (1985) Bacterial alginate produced by a mutant of *Azotobacter vinelandii*. *Appl Environ Microbiol* 49: 543-546
- Ci SX, Huynh TH, Louie LW, Yang A, Beals BJ, Ron N, Tsang WG, Soon-Shiong P, Desai NP (1999) Molecular mass distribution of sodium alginate by high-performance size exclusion chromatography. *J Chromatogr A* 869:199-210
- Clementi F (1997) Alginate production by *Azotobacter vinelandii*. *Crit Rev Biotechnol* 17(4): 327-361

- Clementi F, Crudele MA, Parente E, Mancini M, Moresi M (1999) Production and characterization of alginate from *Azotobacter vinelandii*. *J Sci Food Agric* 79: 602-610
- Clementi F, Paolo F, Mancini F, Moresi M (1995) Optimal conditions for alginate production by *Azotobacter vinelandii*. *Enzyme Microb Technol* 17: 983-988
- Cohen GH (1963) Acid production by *Azotobacter vinelandii*. *Nature* 13: 211
- Conti E, Flabiani A, O'Regan M, Sutherland I (1994) Alginate from *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida*: Production and properties. *Microbiology* 140: 1125-1132
- Davidson IW, Sutherland IW, Lawson CJ (1977) Localization of O-acetyl groups of bacterial alginate. *J Gen Microbiol* 98: 603-606
- Draget KI, Smidsrod O, Skjåk-Bræk G (2001) Alginates from algae. In: Biopolymers. De Baets S, vandamme E, Steinbüchel A (Eds), WILEY-VCH, Volume 6, pgs 215-242
- Ertesvåg H, Erlien F, Skjåk-Bræk G, Rehm BHA, Valla S (1998) Biochemical properties and substrate specificities of a recombinantly produced *Azotobacter vinelandii* alginate lyase. *J Bacteriol* 180: 3779-3784
- Ertesvåg H, Valla S, Skjåk-Bræk G (1996) Genetic and biosynthesis of alginates. *Carbohydr Europe* 14: 14-18
- Espín G (2002) Biología de *Azotobacter vinelandii*. En: Microbios en línea. <http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/index.html>. ISBN 968-36-8879-9
- Gacsa P (1987) Alginate modifying enzymes: a proposed unified mechanism of action for the lyases and epimerases. *FEBS Lett* 211: 199-202
- Gacsa P (1998) Bacterial alginate biosynthesis – Recent progress and future prospects. *Microbiol* 114: 1133-1143
- Gacsa P, Wusteman FS (1990) Plate assay for simultaneous detection of alginate lyases and determination of substrate specificity. *Appl Environ Microbiol* 56: 2265-2267
- Gorin PA, Spencer JFT (1966) Exocellular alginic acid from *Azotobacter vinelandii*. *Can J Chem* 44: 993-998
- Hatch RA, Schiller NL (1998) Alginate lyase promotes diffusion of aminoglycosides through the extracellular polysaccharide of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 42(4): 974-977

- Heeb S, Haas D (2001) Regulatory roles of the GacS/GacA two-component system in plant-associated and other gram-negative bacteria. *Mol Plant Microbe Interact* 14(12):1351-1363
- Hernández-Carmona G, McHugh DJ, Arvizu-Higuera DL, Rodríguez-Montesinos YE (1999a) Pilot plant scale extraction of alginate from *Macrocystis pyrifera*. Part 1. The effect of pre-extraction treatments on the yield and quality of alginate. *J Appl Phycol* 10(6): 507-513
- Hernández-Carmona G, McHugh DJ, López-Gutiérrez F (1999b) Pilot plant scale extraction of alginates from *Macrocystis pyrifera*. 2. Studies on extraction conditions and methods of separating the alkaline-insoluble residue. *J Appl Phycol* 11:493-502
- Horan NJ, Jarman TR, Dawes EA (1981) Effects of carbon source and inorganic phosphate concentration on the production of alginic acid by a mutant of *Azotobacter vinelandii* and the enzymes involved in its biosynthesis. *J Gen Microbiol* 127: 185-191
- Horan NJ, Jarman TR, Dawes EA (1983) Studies on some enzymes of alginic acid biosynthesis in *Azotobacter vinelandii* grown in continuous culture. *J Gen Microbiol* 129: 2985-1990
- Iwamoto Y, Iriyama K, Osatomi K, Oda T, Muramatsu T (2002) Primary structure and chemical modification of some amino acid residues of bifunctional alginate lyase from a marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain no. 272. *J Protein Chem* 21(7): 455-463
- Jarman TR, Deavin L, Slocombe S, Righelato RC (1978) Investigation of the effect of environmental conditions on the rate of exopolysaccharide synthesis in *Azotobacter vinelandii*. *J Gen Microbiol* 107: 59-64
- Kennedy C, Toukdarian A (1987) Genetics of *Azotobacters*: applications to nitrogen fixation and related aspects of metabolism. *Ann Rev Microbiol* 41: 227-258
- Kennedy L, McDowell K, Sutherland IW (1992) Alginases from *Azotobacter* species. *J Gen Microbiol* 138:2465-2471
- Kuhla J, Oelze J (1988) Dependency of growth yield, maintenance and Ks values on the dissolved oxygen concentration in continuous cultures of *Azotobacter vinelandii*. *Arch Microbiol* 149: 509-514

- Kurz WG, LaRue TA (1975) Effect of nitrogen source on carbon metabolism by *Azotobacter vinelandii* OP grown in chemostat and batch culture. *Can J Microbiol* 21 (6):738-741
- Leitão JH, Sá-Correia I (1993) Oxygen-dependent alginate synthesis and enzymes in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gen Microbiol* 139: 441-445
- Leitão JH, Sá-Correia I (1997) Oxygen-dependent upregulation of transcription of alginate genes *algA*, *algC* and *algD* in *Pseudomonas aeruginosa*. *Res Microbiol* 148: 37-43
- Lin TY, Hassid WZ (1966) Isolation of guanosine diphosphate uronic acids from a marine brown alga, *Fucus gardneri* Silva. *J Biol Chem* 241(14): 3283-3293
- Lloret L, Barreto R, Campos ME, Martínez-Salazar JM, Moreno S, Espín G, Soberón-Chávez G (1996) Genetic analysis of the transcriptional arrangement of *Azotobacter vinelandii* alginate biosynthetic genes: identification of two promoters. *Mol Microbiol* 21: 449-457
- López-Munguía A, Brito E, Galindo E (1993) Biopolímeros. En: *Biotecnología Alimentaria*. García-Garibay, Quintero-Ramírez y López-Munguía (Coordinadores). Ed. Limusa. 13: 423-451
- Lynn AN, Sokatch JR (1984) Incorporation of isotope from specially labeled glucose into alginates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol* 158 (3): 1161-1162.
- Martínez-Salazar JM, Moreno S, Nájera R, Boucher JC, Espín G, Soberón-Chávez G, Deretic V (1996) Characterization of the genes coding for the putative sigma factor AlgU and its negative regulators MucA, MucB, MucC and MucD in *Azotobacter vinelandii* and evaluation of their role in alginate biosynthesis. *J Bacteriol* 178:1800-1808
- May TB, Chakrabarty AM (1994) *Pseudomonas aeruginosa*: genes and enzymes of alginate synthesis. *Trends Microbiol* 2:151-157
- Mejía-Ruíz H, Guzmán J, Moreno S, Soberón-Chávez G, Espín G (1997a) The *Azotobacter vinelandii* *alg8* and *alg44* genes are essential for alginate synthesis and can be transcribed from an *algD*-independent promoter. *Gene* 199: 271-277

- Mejía-Ruíz H, Moreno S, Guzmán J, Nájera R, León R, Soberón-Chávez G, Espín G (1997b) Isolation and characterization of an *Azotobacter vinelandii* algK mutant. *FEMS Microbiol Lett* 156: 101-106
- Miller G (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal Chem* 31 (3): 426-428
- Miranda L (1998) Evaluación de cepas mutantes de *Azotobacter vinelandii* en la producción de alginato. Tesis de Ingeniería Química. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, 78 p
- Moe ST, Draget KI, Skjåk Bræk G, Smidsrod O (1995) Alginates In: Food polysaccharides and applications. AM Stephen, ed., Marcel Dekker, New York 9: 245-286
- Moreno S, Guzmán J, Nájera R, Soberón-Chávez G, Espín G (1998) Role of the alternative σ^E factor AlgU in encystment of *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol* 180: 2766-2769
- Núñez C, Moreno S, Cardenas L, Soberón-Chávez G, Espin G (2000a) Inactivation of the *ampDE* operón increases transcription of *algD* and affects morphology and encystment of *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol* 182 (17):4829-4835
- Núñez C, Leon R, Guzmán J, Espín G, Soberon-Chavez G (2000b) Role of *Azotobacter vinelandii* *mucA* and *mucC* gene products in alginate production *J Bacteriol* 182: 6550-6556
- Otto CM, Day DF, Koenig DW, Pierson DL (2001) The release of alginate lyase from growing *Pseudomonas syringae* pathovar *phaseolicola*. *Curr Microbiol* 42(2):78-81
- Parente E, Crudele MA, Aquino M, Clementi F (1998) Alginate production by *Azotobacter vinelandii* DSM576 in batch fermentation. *J Ind Microbiol Biotechnol* 20: 171-176
- Peña C (1998) Producción de alginatos bacterianos por fermentación líquida: estudio de los factores determinantes en la biosíntesis y composición del alginato producido por *Azotobacter vinelandii*. Tesis de Doctorado. Instituto de Biotecnología. UNAM. 108p
- Peña C, Campos N, Galindo E (1997) Changes in alginate molecular mass distributions, broth viscosity and morphology of *Azotobacter vinelandii* cultured in shake flasks. *Appl Microbiol Biotechnol* 48: 510-515

- Peña C, Trujillo-Roldán MA, Galindo E (2000) Influence of dissolved oxygen tension on the polymer molecular weight produced by *Azotobacter vinelandii*. *Enzyme Microb Technol* 27: 390-398
- Peña C, Reyes C, Larralde-Corona P, Corkidi G, Galindo E (2002) Characterization of *Azotobacter vinelandii* aggregation in submerged culture by digital image analysis. *FEMS Microbiol Lett* 207: 173-177
- Pindar DF, Bucke C (1975) The biosynthesis of alginic acid by *Azotobacter vinelandii*. *Biochem J* 152 (3): 617-622
- Preston LA, Bender CL, Schiller NL (2001) Analysis and expression of *algL*, which encodes alginate lyase in *Pseudomonas syringae* P_{v.} *syringae*. *DNA Seq* 12(5-6): 455-461
- Preston LA, Wong TY, Bender CL, Schiller NL (2000) Characterization of alginate lyase from *Pseudomonas syringae* p_{v.} *syringae*. *J Bacteriol* 182(21): 6268-6271
- Pszczola DE (1998) Discovering treasures of the deep. *Food Technol* 52 (4): 74-80
- Ramstad MV, Markussen S, Ellingsen TE, Skjåk-Bræk G, Levine DW (2001) Influence of environmental conditions on the activity of the recombinant mannuronan C5-epimerase Alge2. *Enzyme Microb Technol* 28: 57-69
- Rehm BH (1996) The *Azotobacter vinelandii* gene *algJ* encodes an outer-membrane protein presumably involved in export of alginate. *Microbiol* 142: 873-880
- Rehm BH (1998) Alginate lyase from *Pseudomonas aeruginosa* CF1/M1 prefers the hexameric oligomannuronate as substrate. *FEMS Microbiol Lett* 165(1): 175-180
- Rehm BH, Ertesvåg H, Valla S (1996) A new *Azotobacter vinelandii* mannuronan C-5 epimerase gene (*algG*) is part of *alg* gen cluster physically organized in a manner similar to that in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 178 (20): 5884-5889
- Rehm BH, Valla S (1997) Bacterial alginates. Biosynthesis and applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 48: 281-288
- Sabra W, Zeng AP, Deckwer WD (2001) Bacterial alginate: physiology, product quality and process aspects. *Appl Microbiol Biotechnol* 56:315-325

- Sabra W, Zeng AP, Sabry S, Omar S, Deckwer WD (1999) Effect of phosphate and oxygen concentrations on alginate production and stoichiometry of metabolism of *Azotobacter vinelandii* under microaerobic conditions. *Appl Microbiol Biotechnol* 52: 773-780
- Sabry SA, Ghanem KM, Sabra WA (1992) Effect of nutrients on alginate synthesis in *Azotobacter vinelandii* and characterization of the produced alginate. *Microbiologia* 12(4): 593-598
- Salvagi V, Salvagi V (1992) Alginate production by *Azotobacter vinelandii* in batch culture. *J Gen App Microbiol* 38: 641-645
- Seañez G, Peña C, Galindo E (2001) High CO₂ affects alginate production and prevents polymer degradation in cultures of *Azotobacter vinelandii*. *Enzyme Microb Technol* 29: 535-540
- Sutherland IW (1990) *Biotechnology of Microbial Exopolysaccharides*. Cambridge University Press, 156 pp
- Svanem BI, Skjak-Bræk G, Ertesvåg H, Valla S (1999) Cloning and expression of three new *Azotobacter vinelandii* genes closely related to a previously described gene family encoding mannuronan C-5 epimerases. *J Bacteriol* 181 (1): 68-77
- Svanem BI, Strand WI, Ertesvåg H, Skjåk-Bræk G, Hasrtmann M, Barbeyron T, Valla S (2001) The catalytic activities of the bifunctional *Azotobacter vinelandii* mannuronan C-5-epimerase and alginate lyase AlgE7 probably originate from the same active site in the enzyme. *J Biol Chem* 276: 31542-31550
- Tinoco JR (1993) Obtención de alginatos bacterianos por fermentación líquida de *Azotobacter vinelandii*. Tesis de Maestría. Instituto de Biotecnología, UNAM, 83 p
- Trujillo Roldán MA (1999) Efecto de las oscilaciones en el oxígeno disuelto sobre la producción de alginatos por *Azotobacter vinelandii*. Tesis de Maestría. Instituto de Biotecnología. UNAM. 104 p
- Trujillo-Roldán MA, Peña C, Ramírez OT, Galindo E (2001) Effect of oscillating dissolved oxygen tension on the production of alginate by *Azotobacter vinelandii*. *Biotechnol Prog* 17: 1042-1048

Bibliografía

- Vázquez A, Moreno S, Guzman J, Alvarado A, Espín G (1999) Transcriptional organization of the *Azotobacter vinelandii* *algGXLVIFA* genes: characterization of *algF* mutants. *Gene* 232: 217-222
- Vermani MV, Kelkar SM, Kamat MY (1997) Studies in polysaccharide production and growth of *Azotobacter vinelandii* MTCC2459, a plant rhizosphere isolate. *Lett Appl Microbiol* 24: 379-383
- Wong TY, Preston LA, Schiller NL (2000) Alginate lyase: A review of major sources and enzyme characteristics, structure-function analysis, biological roles, and applications. *Ann Rev Microbiol* 54:289-340

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

9. Anexos

Los artículos que surgieron como resultado del trabajo de éste proyecto, son los siguientes:

1. Trujillo-Roldán MA, Moreno S, Galindo E, Espín G. Alginate production by an *Azotobacter vinelandii* mutant unable to produce alginate lyase. *Appl Microbiol Biotechnol*. 60:733–737, 2003.
2. Mauricio A. Trujillo-Roldán, Carlos Peña and Enrique Galindo. Components in the inoculum determine the kinetics of *Azotobacter vinelandii* cultures and the molecular weight of the alginate. *Biotechnol Lett* 25:1251-1254, 2003.
3. Trujillo-Roldán MA, Moreno S, Espín G, Galindo E. Roles of the polymerase complex and alginate-lyase in determining the molecular weight of alginate produced by *Azotobacter vinelandii*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003 (In press).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

M. A. Trujillo-Roldán · S. Moreno · D. Segura ·
E. Galindo · G. Espín

Alginate production by an *Azotobacter vinelandii* mutant unable to produce alginate lyase

Received: 4 April 2002 / Revised: 26 September 2002 / Accepted: 12 October 2002 / Published online: 18 December 2002
© Springer-Verlag 2002

Abstract Alginate is an industrially relevant linear copolymer composed of β -1,4-linked D-mannuronic acid and its C-5 epimer L-guluronic acid. The rheological and gel-forming properties of alginates depend on the molecular weight and the relative content of the two monomers. Alginate produced by *Azotobacter vinelandii* was shown to be degraded towards the end of the culture, an undesirable situation in terms of potential alginate applications. A gene (*algL*) encoding the alginate lyase activity AlgL is present within the alginate biosynthetic gene cluster of *A. vinelandii*. We constructed strain SML2, an *A. vinelandii* strain carrying a non-polar mutation within *algL*. No alginate lyase activity was detected in SML2. Under 3% dissolved oxygen tension, higher values of maximum mean molecular weight alginate were obtained (1,240 kDa) with strain SML2, compared to those from the parental strain ATCC 9046 (680 kDa). These data indicate that AlgL activity causes the drop in the molecular weight of alginate produced by *A. vinelandii*.

Introduction

The main applications of alginates are as thickeners, stabilizers, gelling agents and emulsifiers in the food, textile and pharmaceutical industries (Sabra et al. 2001). Commercial alginates are currently extracted from marine algae such as *Laminaria* and *Macrocystis*. Because *Azotobacter vinelandii* produces alginates similar to the

algal alginates (Skjak-Bræk et al. 1986), this bacterium appears suitable for alginate production.

The rheological and gel-forming properties of alginates depend on the molecular mass distribution and on the relative content of the two monomers (Skjak-Bræk et al. 1986). Oxygen concentration has been shown to influence the molecular weight of alginate produced by *A. vinelandii* (Peña et al. 2000). A high molecular weight alginate can be produced at a dissolved oxygen tension (DOT) of 3%. However, a drop in the mean molecular weight (MMW) of alginate was observed towards the end of the incubation period (Peña et al. 2000). This drop in the MMW of alginate is undesirable because of the lower rheological quality of low molecular weight alginates (Ci et al. 1999; Wong et al. 2000). The drop could be caused by the alginate lyase activity encoded by the *algL* gene, which is present within the alginate biosynthetic gene cluster (Lloret et al. 1996; Ertesvag et al. 1998).

AlgL activity has also been suggested to have a role in the germination of the cysts formed by this bacterium (Kennedy et al. 1992) and in alginate synthesis (Wong et al. 2000).

In this work, we report the construction and characterization of a strain with a non-polar mutation in *algL*, which does not block expression of other alginate biosynthetic genes. It is shown that under DOT-controlled conditions (which regulate alginate MMW) this strain produced alginate with a higher MMW than the parental strain and no degradation of the polymer was observed at late stages of the culture.

Materials and methods

Microbiological procedures

A. vinelandii strains used in this work were: wild type ATCC 9046 (Campos et al. 1996) and its derivatives SML1 and SML2 carrying *algL:: Ω Gm* polar and non-polar mutations, respectively (this work). SML1 and SML2 strains are conserved in the Microbial Culture Collection of the Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico D.F., with codes

S. Moreno · D. Segura · G. Espín (✉)
Department of Molecular Microbiology, Instituto de Biotecnología,
Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 510–3,
Cuernavaca 62250 Morelos, Mexico
e-mail: espin@ibt.unam.mx
Tel.: +52-777-3291644
Fax: +52-777-3172388

M.A. Trujillo-Roldán · E. Galindo
Department of Bioengineering, Instituto de Biotecnología,
Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 510–3,
Cuernavaca 62250 Morelos, Mexico

BM-B-376 and BM-B-377, respectively. *A. vinelandii* strains were grown in a modified Burk's medium (Peña et al. 1997) at 30°C. Encystment experiments were carried out as previously described (Campos et al. 1996).

Nucleic acid procedures

DNA isolation, cloning and Southern blotting were performed using standard procedures (Sambrook et al. 1989).

Construction of plasmids pAD2 and pAD3

Oligonucleotides *algL1* 5'-GAATTCGCCATGGAAATCCAGC and *algL2* 5'-GAATTCGCTCTGTTGCGCATTTC and plasmid pAV6 containing the *algXIVFA* genes, accession number AF027499 (Vázquez et al. 1999), were used to obtain a 1.3 kb fragment containing the *algL* gene by PCR; this fragment was cloned into plasmid pBluescript KS (Stratagene) to give plasmid pSML. A 0.8 kb fragment containing a Ω -gentamicin-resistance gene (*Gm*) from plasmid pBSL141 (Alexeyev et al. 1995), was inserted into the unique *EcoRV* site in pSML to create an insertion mutation between codons for amino acids 39 and 40 of the AlgL protein. We selected plasmid pSML1 and pSML2 with the cassette inserted with opposite (pSML1) or the same (pSML2) orientation, as *algL* transcription.

Culture conditions

Batch cultures were carried out in a 1.5 l stirred tank (Virtis, initial working volume of 1.0 l) mounted on an Omni-culture support. The bioreactor was equipped with two Rushton impellers (ratio of impeller:tank diameter = 0.5) and two baffles. Temperature was maintained at 29±1°C, and pH was controlled at 7.2±0.2 by automatic addition of NaOH (2 N). Fermentations were conducted at a constant agitation rate of 300 rpm and DOT was kept constant at 3% with respect to air saturation. DOT was controlled by varying the proportions of nitrogen and oxygen in the inflowing gas and maintaining a constant total gas flow rate of 800 ml/min, using a proportional-integral-derivative control algorithm (Trujillo-Roldán et al. 2001).

Analytical determinations

Biomass and alginate concentrations were determined gravimetrically as described previously (Peña et al. 2000). Molecular weight distribution was estimated by gel-permeation chromatography as described previously (Peña et al. 2000). A serial set of ultrahydrogel columns (UG 500 and linear, Waters), using a conventional HPLC system with a differential refractometer detector (Waters, 410) were used. The eluant was 0.1 M NaNO₃ at 35°C at a flow of 0.9 ml/min. Pullulans from *Aureobasidium pullulans* (from 5,800 to 1,600,000 Da) were used as standard. Alginate samples were filtered through a 0.22 µm Millipore membrane to remove microgels and a sample of 50 µl was subsequently injected into the HPLC system. Polydispersity index (P.I.) was determined as the ratio of MMW (weighting the polymer molecules according to the weight of those having a specific molecular mass), to mean number weight (weighting the polymer molecules according to the number of those having a specific molecular mass). Viscosity of the culture broth was measured in a cone/plate viscosimeter (Wells-Brookfield LVT, series 82198) as previously described (Peña et al. 1997). All determinations were carried out at room temperature (25°C) and 6 rpm using cone CP-52, which – according to the manufacturer – corresponds to a shear rate of 12 s⁻¹.

Alginate lyase activity

A 10 ml sample of culture broth was mixed with 1.0 ml Na₂EDTA (0.1 M) and 1.0 ml NaCl (1.0 M) and then centrifuged at 17,400 g for 20 min. To remove slime polysaccharide, 3.0 ml calcium chloride (10%) was added to 10 ml supernatant. After storage at 4°C for 3 h, the resultant precipitate was removed by centrifugation (17,400 g, 20 min). The supernatant was dialyzed against 0.02 M Tris-HCl buffer, pH 7.2. The lyase activity was measured by a spectrophotometrical assay as previously described (Ertesvag et al. 1998). One milliliter containing 2.0 mg/ml of high viscosity commercial alginate (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo.), 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2) and 1 ml crude extract obtained as described above, were mixed and incubated at 29°C. The increase in the absorbance was monitored. Specific activity was expressed as the change in absorbance at 235 nm, per minute per milligram of protein. Alginate lyase activity was also determined by the plate assay method as previously reported (Lloret et al. 1996).

Results

Construction of *algL* mutants

In *A. vinelandii*, *algL* encoding an alginate lyase activity forms part of the *algGXLIVFA* operon (Vázquez et al. 1999), where *algA* encodes the bifunctional enzyme that catalyzes the first and third enzymatic steps of the alginate biosynthetic pathway. It has previously been shown that, in *A. vinelandii*, the insertion of the Ω cassettes into genes with the same orientation as the direction of transcription produces non-polar mutations that allow transcription of the downstream genes in the same operon (Vázquez et al. 1999). Plasmids pSML1 and pSML2 that carry *algL::ΩGm* polar and non-polar mutations, respectively, are unable to replicate in *A. vinelandii* and were constructed as described in Materials and methods. These plasmids were transformed into strain ATCC 9046 by the method of Bali et al. (1992). Strains SML1 and SML2, resistant to gentamicin, were selected and confirmed by Southern blot analysis (Fig. 1), to carry the *algL::ΩGm* polar and non-polar mutations, respectively.

As expected, strain SML1 carrying the *algL::ΩGm* polar mutation did not produce alginate (Table 1), whereas strain SML2 carrying the non-polar *algL::ΩGm* insertion produced alginate when grown on plates with Burk's medium supplemented with 2% sucrose (Table 1). Alginate production in strain SML2 was lower than in the parental strain ATCC 9046. The MMW and P.I. values for the alginate produced by SML2 grown in solid medium differ from those of the wild type (Table 1).

Effect of the *algL* mutation on alginate lyase activity

Figure 2 shows the alginate lyase activity of strains ATCC 9046, SML1 and SML2 grown for 48 h on solid Burk's medium supplemented with sucrose and alginate. A halo indicating the degradation of alginate by the lyase activity is observed in the wild type but not in the SML1 and SML2 mutants. Alginate lyase activity was also deter-

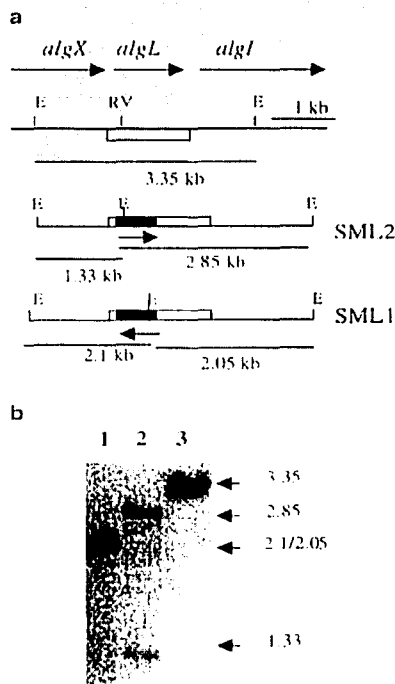


Fig. 1 a Schematic representation of the *algL* chromosomal region of SML1 and SML2 strains. *E. EcoRI*, *RV. EcoRV*. Arrows Direction of transcription. *black bars* Ω -Gm cassette. b Southern blot hybridization of *EcoRI*-digested genomic DNA from SML1 (lane 1), SML2 (lane 2) and ATCC 9046 (lane 3). The 1.3 kb fragment from plasmid pSML containing *algL* was used as a probe

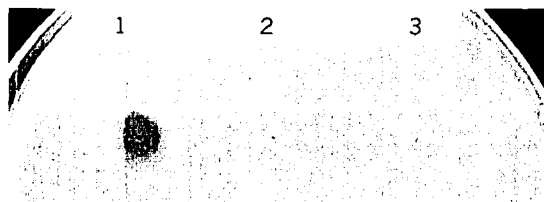


Fig. 2 Alginate lyase activity plate assay. Cells were grown for 48 h on Burk's modified medium containing alginate, then washed with distilled water and assayed for alginate lyase activity (see Materials and methods)

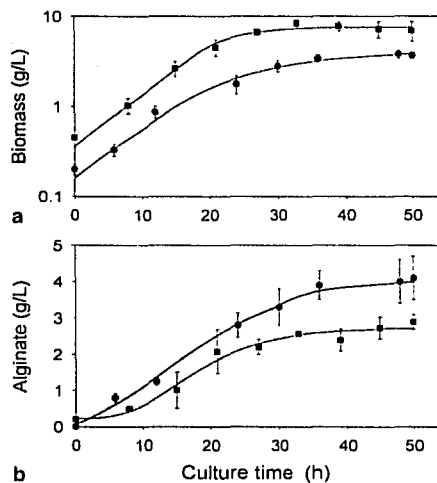


Fig. 3 Kinetics of biomass growth (a), and alginate production (b) of batch cultures of *Azotobacter vinelandii* SML2 (squares) and ATCC 9046 (circles), carried out at 3% dissolved oxygen tension (DOT) and 300 rpm

mined in batch cultures (conducted at 3% DOT) of strains SML2 and ATCC 9046. At 48 h incubation, an activity value of 0.004 U/mg protein was detected in strain ATCC 9046, whereas no activity was detected in strain SML2.

Bacterial growth and alginate production

Peña et al. (2000) showed that small variations of DOT (in the range of 1.0–5.0%) had significant effects on

alginate production and on its molecular weight. Accordingly, SML2 and ATCC 9046 were grown under conditions of DOT 3%. Figure 3a shows biomass growth kinetics. Figure 3b shows the evolution of alginate during the course of these fermentations. A final alginate concentration of 2.6 g/l was obtained with the SML2

Table 1 Alginate production, in *Azotobacter vinelandii* *algL* mutants. *MMW* Mean molecular weight, *P.I.* polydispersity index

Strain	Alginate ^a (mg/mg protein)	MMW ^a (kDa)	P.I. ^a	Encystment ^b (%)
ATCC 9046	2.35±0.32	905	3.2	10±2.8
SML1	0.021±0.001	N.D. ^c	N.D.	<0.0001
SML2	1.16±0.32	1,263	3.9	10±2.4

^a Determined on cultures grown on agar plates incubated for 48 h in Burk's nitrogen-free salts medium supplemented with sucrose at 2%

^b Encystment values are the percentage of cells resistant to desiccation after induction with *n*-butanol. Values are the mean of two determinations

^c Not determined

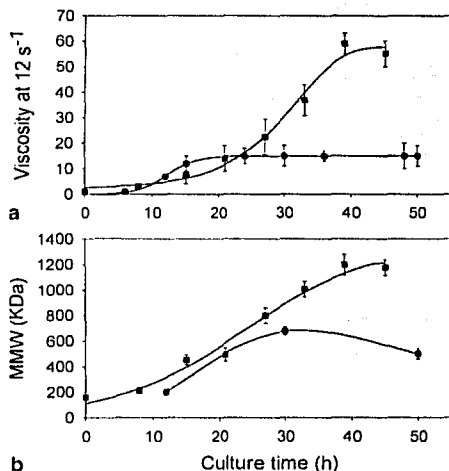


Fig. 4 Evolution of the broth viscosity measured at a shear rate of 12 s⁻¹ (a) and mean molecular weight (MMW) (b) of alginate produced by strain SML2 (squares) and ATCC 9046 (circles) in batch cultures carried out at 3% DOT at 300 rpm

mutant. This concentration was lower than that produced by ATCC 9046 (4.0 g/l). Specific alginate production rate (SARP) for SML2 (0.011 g g⁻¹ h⁻¹) was lower than that observed with the wild type (0.026 g g⁻¹ h⁻¹).

Viscosity and alginate MMW in SML2 cultures

Figure 4a shows viscosity kinetics. Higher viscosity was observed with SML2 (59 cps) compared to the parental strain (15 cps). The viscosity and thickening properties of the polymer are highly influenced by the molecular weight of alginate. As shown in Fig. 4b, SML2 exhibited a maximum MMW of 1,240 kDa (P.I. 3.1) and no depolymerization of the alginate was observed. When the molecular weight of alginate obtained with SML2 mutant was compared with that of the ATCC 9046 strain (before depolymerization), a maximum MMW of 680 kDa (P.I. 3.5) was found. In the case of the wild type, depolymerization of alginate was observed at late stages of the culture, reaching a value of 500 kDa (P.I. 5.2). This result is in agreement with published data, where alginate from *Macrocystis pyrifera* incubated with supernatant of ATCC 9046 cultures underwent a decrease in the MMW from 1,050 kDa to 600 kDa (Peña et al. 2000).

Cyst germination in strain SML2

AlgL activity has been suggested to have a role in the rupture of the cyst capsule during germination (Kennedy et al. 1992). However, encystment and cyst germination

by strain SML2 were tested and found to be similar to the ATCC 9046 wild type strain (Table 1 and data not shown).

Discussion

The construction of strain SML2 with a non-polar *algL* mutation that allowed alginate synthesis was achieved in this study, allowing us to test the role of the AlgL activity in the drop in the MMW of alginate observed at the end of the incubation period.

As shown in Fig. 3, an alginate production of 2.9 and 4.0 g/l was obtained for strains SML2 and ATCC 9046, respectively. These values are within the range reported in the literature for cultures of *A. vinelandii* under non-controlled DOT conditions (Brivonese and Sutherland 1989; Peña et al. 1997; Clementi et al. 1999) and under constant (Sabra et al. 1999; Peña et al. 2000), or oscillatory controlled DOT (Trujillo-Roldán et al. 2001). On the other hand, the SARP for SML2 (0.011 g g⁻¹ h⁻¹) and ATCC 9046 (0.026 g g⁻¹ h⁻¹) were similar to those reported previously (Parente et al. 1998; Peña et al. 2000).

Figure 4b shows a typical profile of polymerization/depolymerization of the alginate produced by the ATCC 9046 strain. Similar profiles have been reported by Peña et al. (2000) under different culture conditions. Clementi et al. (1999) also reported that the rate of increase of molecular weight was strictly growth-associated and alginate depolymerization was observed as soon as exponential cell growth stopped. Sabra et al. (1999) reported a depolymerization profile of alginate and tried to relate this to a phosphate limitation and the action of alginate lyases. This study shows that no depolymerization of alginate was found with strain SML2 (Fig. 4b). This characteristic of strain SML2 is desirable, from the biotechnological point of view, as high molecular weight alginates are more valued due to better rheological quality (Ci et al. 1999; Wong et al. 2000). The P.I. is the ratio of the MMW to mean number weight; thus, lower values of P.I. are desirable as a narrower dispersion of the molecules gives a better uniform family, making the alginate more valued. Alginate produced by SML2 cultures had a P.I. around 3.5–4.0. These values are within the range of those characteristic of commercial alginates derived from algae (Peña et al. 1997).

Finally, regarding the proposed roles of alginate lyase activity in alginate production or cyst germination, this study shows that, under the conditions tested, the non-polar *algL* mutation constructed here does not affect these cellular processes.

Acknowledgements This work was partially financed by DGAPA-UNAM (grant IN 216700) and CONACyT (grant 31540-B). M.A. Trujillo-Roldán is indebted to DGEP-UNAM (PhD scholarship) and to COLCIENCIAS-Colombia. The experiments comply with the current laws of Mexico.



References

- Alexeyev MF, Shokolenko I, Croughan TP (1995) Improved antibiotic-resistance gene cassettes and omega elements for *Escherichia coli* vector construction and in vitro deletion/insertion mutagenesis. *Gene* 160:63-67
- Bali A, Blanco G, Hill S, Kennedy C (1992) Excretion of ammonium by a *nifL* mutant of *Azotobacter vinelandii* fixing nitrogen. *Appl Environ Microbiol* 58:1711-1718
- Brivonese AC, Sutherland IW (1989) Polymer production by a mucoid strain of *Azotobacter vinelandii* in batch culture. *Appl Microbiol Biotechnol* 30:97-102
- Campos ME, Martínez-Salazar JM, Lloret L, Moreno S, Núñez C, Espín G, Soberón-Chávez G (1996) Characterization of the gene coding for GDP-mannose dehydrogenase (*algD*) from *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol* 178:1793-1799
- Ci SX, Huynh TH, Louie LW, Yang A, Beals BJ, Ron N, Tsang WG, Soon-Shiong P, Desai NP (1999) Molecular mass distribution of sodium alginate by high-performance size exclusion chromatography. *J Chromatogr A* 869:199-210
- Clementi F, Crudele MA, Parente E, Mancini M, Moresi M (1999) Production and characterization of alginate from *Azotobacter vinelandii*. *J Sci Food Agric* 79:602-610
- Ertesvag H, Erlien F, Skjak-Braek G, Rehm BHA, Valla S (1998) Biochemical properties and substrate specificities of a recombinantly produced *Azotobacter vinelandii* alginate lyase. *J Bacteriol* 180:3779-3784
- Kennedy L, McDowell K, Sutherland IW (1992) Alginases from *Azotobacter* species. *J Gen Microbiol* 138:2465-2471
- Lloret L, Barreto R, Campos ME, Martínez-Salazar JM, Moreno S, Espín G, Soberón-Chávez G (1996) Genetic analysis of the transcriptional arrangement of *Azotobacter vinelandii* alginate biosynthetic genes: identification of two promoters. *Mol Microbiol* 21:449-457
- Parente E, Crudele MA, Aquino M, Clementi F (1998) Alginate production by *Azotobacter vinelandii* DSM576 in batch fermentation. *J Ind Microbiol Biotechnol* 20:171-176
- Peña C, Campos N, Galindo E (1997) Changes in alginate molecular mass distributions, broth viscosity and morphology of *Azotobacter vinelandii* cultured in shake flasks. *Appl Microbiol Biotechnol* 48:510-515
- Peña C, Trujillo-Roldán MA, Galindo E (2000) Influence of dissolved oxygen tension on the polymer molecular weight produced by *Azotobacter vinelandii*. *Enzyme Microb Technol* 27:390-398
- Sabra W, Zeng AP, Sabry S, Omar S, Deckwer WD (1999) Effect of the phosphate and oxygen concentration on alginate production and stoichiometry of metabolism of *Azotobacter vinelandii* under microaerobic conditions. *Appl Microbiol Biotechnol* 52:773-780
- Sabra W, Zeng AP, Deckwer WD (2001) Bacterial alginate: physiology, product quality and process aspects. *Appl Microbiol Biotechnol* 56:315-325
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Skjak-Braek G, Smidsrad O, Larsen B (1986) Tailoring of alginates by enzymatic modification in vitro. *J Biol Macromol* 8:330-336
- Trujillo-Roldán MA, Peña C, Ramírez OT, Galindo E (2001) Effect of oscillating dissolved oxygen tension on the production of alginate by *Azotobacter vinelandii*. *Biotechnol Prog* 17:1042-1048
- Vázquez A, Moreno S, Guzmán J, Alvarado A, Espín G (1999) Transcriptional organization of the *Azotobacter vinelandii* *algXLMIFA* genes: characterization of *algG* mutants. *Gene* 232:217-222
- Wong TY, Preston LA, Schiller NL (2000) Alginate lyase: a review of major sources and enzyme characteristics, structure-function analysis, biological roles, and applications. *Annu Rev Microbiol* 54:289-340

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Components in the inoculum determine the kinetics of *Azotobacter vinelandii* cultures and the molecular weight of its alginate

Mauricio A. Trujillo-Roldán, Carlos Peña & Enrique Galindo*

Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 510-3, Cuernavaca 62250 Morelos, México

*Author for correspondence (Fax: (52) (777) 3172.388; E-mail: galindo@ibt.unam.mx)

Received 3 April 2003; Revisions requested 2 May 2003; Revisions received 27 May 2003; Accepted 28 May 2003

Key words: alginate, alginate lyase, *Azotobacter vinelandii*

Abstract

In cultures of *Azotobacter vinelandii* inoculated using washed cells (avoiding exhausted broth components) alginates of a higher molecular weight (1200 kDa) than those obtained in cultures conventionally inoculated (350 kDa), were produced. Also, when comparing conventionally inoculated cultures with those inoculated with washed-cells, the alginate lyase activity was delayed and the final polymer concentration decreased from 4.8 to 3.5 g l⁻¹. This suggests that components in the exhausted inoculum broth play important regulatory roles in alginate biosynthesis and needs to be taken into account when describing polymer biosynthesis.

Introduction

Alginate is a non-branched β 1-4 linked exopolysaccharide composed of β -D-mannuronic acid (M) and its C₅ epimer, α -L-guluronic acid (G), arranged in irregular blocks. These polymers are extracted from several different species of brown marine algae (Gacesa 1998). Bacterial species, such as the N₂-fixing aerobic *Azotobacter vinelandii*, also produces alginates (Gacesa 1998) and it has been considered as a potential commercial option to produce this polysaccharide.

The viscosity of alginate solutions depends mainly on the molecular weight (MW) of the polymer and, to a lesser extent, on its composition, i.e. M/G ratio and the length of sequences of M-M, M-G and G-G (Gacesa 1998). The production and molecular weight of alginates by *A. vinelandii* is strongly influenced by the dissolved O₂ tension (DOT). A high molecular weight alginate can be produced at a controlled DOT of 3%, with respect to air saturation (Peña *et al.* 2000). However, a drop in the mean molecular weight (MMW) and an increase of the polydispersion degree of alginate was observed towards the end of the incubation period (Peña *et al.* 2000). This drop in the MMW is undesirable because of the lower rheological quality

of low molecular weight alginates (Wong *et al.* 2000). This depolymerization is caused by the action of an extracellular alginate lyase activity encoded by the *algL* gene, which is present within the alginate biosynthetic gene cluster (Ertesvag *et al.* 1998, Trujillo-Roldán *et al.* 2003).

Alginate production by submerged culture involves a series of conventional steps, including inoculum build-up. The typical inoculation process consists in the proliferation of cells in a pre-culture consisting of 1 to 20% (v/v) of the working volume of the production fermenter, where the exhausted culture medium is added – together with the bacterial cells – to the new medium into the fermenter. By washing the cells prior to inoculation it would be possible to avoid the presence of the components of the exhausted culture medium. This work reports a study aimed at determining how these components in the inoculum affect alginate biosynthesis and its molecular characteristics. This information is highly relevant for the proper interpretation of results of studies about polymer biosynthesis.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Materials and methods

Microorganisms and culture conditions

Azotobacter vinelandii ATCC9046 was grown on a modified Burk's medium (Peña *et al.* 1997) of the following composition (in g l⁻¹): sucrose 20; yeast extract (Difco) 3, K₂HPO₄ 0.66, KH₂PO₄ 0.16, MOPS 1.42, CaSO₄ 0.05, NaCl 0.2, MgSO₄ · 7H₂O 0.2, Na₂MoO₄ · 2H₂O 0.0029, FeSO₄ · 7H₂O 0.027. The pH was adjusted to 7.2 with NaOH. To avoid precipitation during autoclaving, the solutions of FeSO₄ · 7H₂O and Na₂MoO₄ · 2H₂O were separated from the other medium components during sterilization (121 °C, 35 min). Cultures were carried out in batch in a 1.5 l stirred tank (Virtis, working volume of 1.0 l) mounted on an Omni-culture support, equipped with 2 Rushton impellers (ratio of impeller: tank diameter = 0.5). Peña *et al.* (2000) reported that small variations of DOT (in the range of 1–5%) had significant effects on alginate production and on its molecular weight. Accordingly, all cultures were carried out at 3% DOT. The dissolved O₂ tension and pH (7.2) were measured and controlled using a proportional-integral-derivative control system (Peña *et al.* 2000, Trujillo-Roldán *et al.* 2001). DOT was controlled at 3% with respect to air saturation by varying the proportions of N₂ and O₂ in the inflowing gas (Peña *et al.* 2000). The cultures were grown at 29 °C using an agitation rate of 700 rpm and a total gas (N₂ + O₂) flow rate of 0.8 vvm.

Preparation of inocula

Two types of inoculation procedures were evaluated. One was the conventional form which consists in the incubation for 24 h at 29 °C in a 500 ml conventional Erlenmeyer flask using 100 ml Burk's modified medium (Peña *et al.* 1997). The whole broth – including cells – (100 ml) were inoculated into the bioreactor containing 900 ml fresh culture medium.

A second inoculation procedure consisted in the following: after the incubation in a shake-flask (24 h), the bacteria were aseptically collected by two steps of centrifugation at 15 500 × g, during 10 min at 29 °C, and re-suspended in 100 ml of fresh Burk's liquid medium. This suspension was inoculated into the fermenter containing 900 ml of fresh culture medium.

Analytical determinations

Biomass, alginate and sucrose concentration were determined as reported previously by Peña *et al.*

(1997). Molecular weight distribution (MWD) and mean molecular weight (MMW) were estimated by gel-permeation chromatography (Peña *et al.* 1997, 2000). Polydispersity index (PI) was defined as the ratio of MMW (weighting the polymer molecules according to the weight of those having a specific molecular mass) to mean number weight (weighting the molecules according to the number of those having a specific molecular mass). Alginate-lyase activity was measured using a spectrophotometrical assay as previously reported by Peña *et al.* (2000). Specific alginate lyase activity was expressed as the change in absorbance at 235 nm per minute per mg of soluble extracellular protein. Soluble extracellular protein was quantified using the Bio-Rad Protein Assay Kit. Viscosity of the culture broth was measured as previously reported by Peña *et al.* (1997) at a shear rate of 12 s⁻¹ in a cone/plate viscosimeter (Wells-Brookfield LVT, series 82198), using cone CP-52.

Conventionally inoculated cultures and those inoculated using washed cells were made in triplicates. Figure 1 shows the mean value of the independent cultures and the standard deviation among replicas.

Results and discussion

Similar biomass growth kinetics were observed with both types of inoculation (Figure 1a). Sucrose was completely consumed at the end of all cultures (data not shown). A lower value of final alginate concentration was obtained with the washed-cells inoculated cultures than that observed in the cultures inoculated in the conventional way (Figure 1b). That means that the yield (1.2 g_{alg}/g_{biom}) and the specific alginate production rate (0.06 g_{alg}/g_{biom} h) in conventionally inoculated cultures were higher than those observed in washed-cells inoculated cultures (1.16 g_{alg}/g_{biom} and 0.042 g_{alg}/g_{biom} h, respectively).

The final broth viscosity of the washed-cells inoculated cultures was 6.5 fold higher than that of the cultures conventionally-inoculated (Figure 1c). As Figures 1d, 1e and 2 show, higher molecular weight and less dispersed families of alginates were obtained in washed-cells inoculated cultures, as compared to the conventionally inoculated cultures. A depolymerization of alginate was observed at late stages of the cultures with an increase in the PI. In washed-cells inoculated cultures, a drop from 1250 (PI = 6) to 980 kDa (PI = 6.8) was observed and in

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

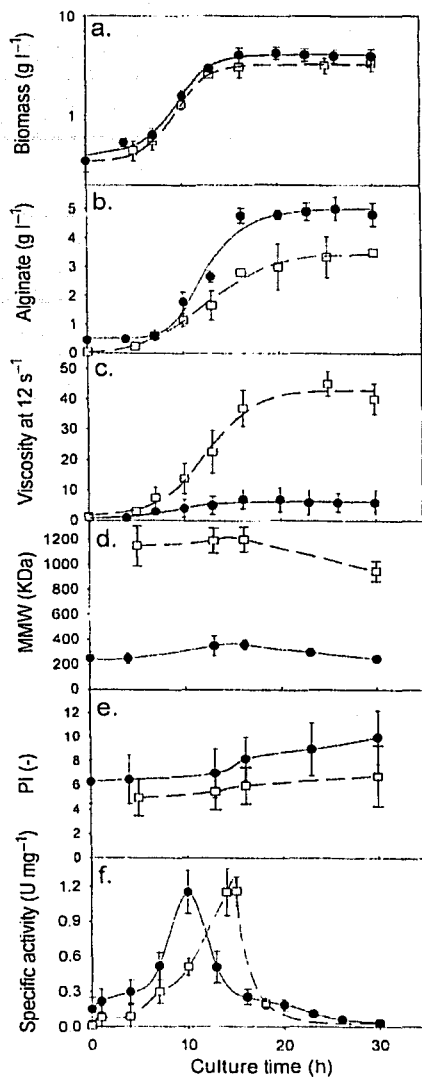


Fig. 1. Biomass growth (a), alginate production (b), broth viscosity (c), mean molecular weight (MMW) (d), polydispersity index PI (e) and specific alginate lyase activity (f) of conventionally (●) and washed-cells (□) inoculated cultures.

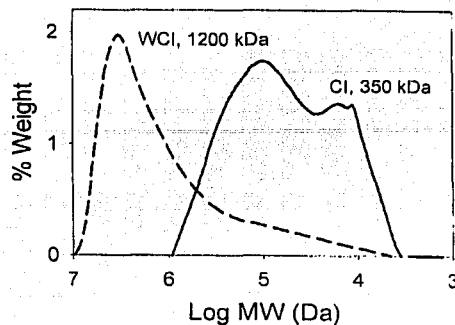


Fig. 2. Molecular weight distributions of alginates obtained in conventionally inoculated (CI) and washed-cells inoculated (WCI) cultures (samples taken at 13 h of culture, before depolymerization caused by the alginate lyase activity).

conventionally-inoculated ones, the drop was from 350 (PI = 8.2) to 250 kDa (PI = 10).

In conventionally inoculated cultures, alginate lyase activity was detectable from the beginning of the culture (Figure 1f), and the maximum in its activity, occurring in the middle of the exponential phase of growth, might be one of the reasons of the low MMW of the alginate observed under these conditions. If this is compared with the washed-cells cultures, the MMW was higher and the maximum in its alginate lyase activity was delayed until the pre-stationary phase (Figure 1f). It is possible that the alginate produced during the culture is being degraded by the alginate lyase. However, the drop in the MMW is only detectable at the end of the culture.

Conventionally inoculated cultures start with alginate at 0.45 g l^{-1} , with a MMW of 250 kDa and a specific alginate lyase activity of 0.15 U mg^{-1} (Figures 1b, 1d and 1f). All these components come from the inoculum build-up. On the other hand, cultures inoculated using washed-cells have no alginate and no alginate lyase activity at the beginning of the culture. The presence of such components at the beginning of the conventionally inoculated cultures are affecting the behavior of the cultures. However, these small initial differences in alginate and alginate lyase cannot explain, alone, the differences in the culture kinetics and can not be caused by a simple phenomenon of dilution. For example, at the middle of the exponential phase of growth (10 h), the differences in alginate concentration become more pronounced and, at the

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

end of the culture (30 h), the difference between the conventionally inoculated (4.8 g l^{-1}) and washed-cells inoculated (3.5 g l^{-1}) cultures was of 1.3 g l^{-1} which is nearly three fold the initial alginate concentration difference. The delay in the appearance of the alginate lyase and the significant differences in the kinetics of alginate biosynthesis (with practically no change in biomass kinetics) suggest that small amounts of alginate and/or alginate lyase as well as other unknown components (carried from the inoculum) might serve as environmental signals that modify alginate production and/or the action of the alginate lyase activity. Castañeda *et al.* (2000, 2001) reported that the growth of the bacteria and the biosynthesis of the alginate is regulated by the two protein component system GaeA/GaeS. A current model proposes that GaeS senses unknown environmental signals and activates the GaeA transcription regulator, which in turn triggers the expression of target genes involved in alginate biosynthesis (Castañeda *et al.* 2000, 2001). Although further studies are needed, this postulated mechanism could be one of the possibilities for explaining the strong effect that these unknown components have on the biosynthesis of alginate.

Our results are also relevant for the proper interpretation of detailed physiological studies of the production of alginate by *A. vinelandii*. The effect of exhausted broth components (from the inoculum) has to be taken into account (or avoided) in such studies, particularly, in the analysis of complex phenomena such as that of polymerization and depolymerization of the alginate chains in *A. vinelandii* cultures.

Conclusions

The components carried by the exhausted broth from the inoculum are playing an important regulatory role in alginate biosynthesis and in defining its molecular characteristics. By washing the cells prior to inoculation, it is possible to avoid the presence of such components. This new form to inoculate the *A. vinelandii* cultures will allow one to conduct studies in a more controlled way and properly to interpret data from alginate biosynthesis studies.

Acknowledgements

This work was partially financed by DGAPA-UNAM (grant IN-119598) and CONACYT (grant 31150-B). MA Trujillo-Roldán is indebted to DGEF-UNAM (PhD scholarship) and to Foundation "Francisco José de Caldas" COLCIENCIAS-Colombia (MSc scholarship). The authors thank Martin Peralta-Gil for helpful discussions.

References

- Castañeda M, Guzman J, Moreno S, Espín G (2000) The GaeS sensor kinase regulates alginate and poly- β -hydroxybutyrate production in *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **182**: 2624-2628.
- Castañeda M, Sanchez J, Moreno S, Nunez C, Espín G (2001) The global regulators GaeA and σ^7 form part of a cascade that controls alginate production in *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **183**: 6787-6793.
- Ertesvag H, Erlien F, Skjak-Brek G, Rehm BHA, Valla S (1998) Biochemical properties and substrate specificities of a recombinantly produced *Azotobacter vinelandii* alginate lyase. *J. Bacteriol.* **180**: 3779-3784.
- Gaeesa P (1998) Bacterial alginate biosynthesis - recent progress and future prospects. *Micobiology* **114**: 1133-1143.
- Peña C, Campos N, Galindo E (1997) Changes in alginate molecular mass distributions, broth viscosity and morphology of *Azotobacter vinelandii* cultured in shake flasks. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**: 510-515.
- Peña C, Trujillo-Roldán MA, Galindo E (2000) Influence of the dissolved oxygen tension on the polymer molecular weight produced by *Azotobacter vinelandii*. *Enzyme Microb. Technol.* **27**: 390-398.
- Trujillo-Roldán MA, Moreno S, Galindo E, Espín G (2003) Alginate production by an *Azotobacter vinelandii* mutant unable to produce alginate lyase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**: 733-737.
- Trujillo-Roldán MA, Peña C, Ramirez OI, Galindo E (2001) Effect of oscillating dissolved oxygen tension on the production of alginate by *Azotobacter vinelandii*. *Biotechnol. Prog.* **17**: 1042-1048.
- Wong TY, Preston LA, Schiller NL (2000) Alginate lyase: a review of major sources and enzyme characteristics, structure-function analysis, biological roles, and applications. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**: 289-340.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

PAGINACIÓN DISCONTINUA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Applied Microbiology and Biotechnology

© Springer-Verlag 2003

DOI 10.1007/s00253-003-1419-z

Original Paper

The roles of oxygen and alginate-lyase in determining the molecular weight of alginate produced by *Azotobacter vinelandii*

M. A. Trujillo-Roldán · S. Moreno · G. Espín · E. Galindo (✉)

M. A. Trujillo-Roldán · E. Galindo

Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 510-3, 62250 Cuernavaca, Morelos, Mexico

S. Moreno · G. Espín

Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 510-3, 62250 Cuernavaca, Morelos, Mexico

✉ E. Galindo

Fax: +52-777-3172388

E-mail: galindo@ibt.unam.mx

Received: 6 April 2003 / Revised: 8 July 2003 / Accepted: 18 July 2003

Abstract An *Azotobacter vinelandii* mutant lacking alginate-lyase (SML2) and the wild type (ATCC9046) were used to discriminate between the roles of the polymerase complex and alginate-lyase in the synthesis of alginate in cultures conducted under controlled dissolved oxygen tension (DOT). To avoid the presence of pre-synthesized alginates, all cultures were inoculated with washed cells. For cultures carried out at 3% DOT using the mutant, a well defined family of alginates of high mean molecular weight (MMW) were obtained (985 kDa). Under 1% and 5% DOT, the mutant produced unique families of alginates with lower MMW (150 and 388 kDa). A similar behavior was observed using the wild type: a production of well defined families of alginates of high MMW at 3% DOT (1,250 kDa) and lower MMW at 1% and 5% DOT (370 and 350 kDa). At the end of the ATCC9046 fermentations, alginate was depolymerized by the action of lyases. Overall, the evidence indicated that polymerization of alginate is carried out by producing families of polysaccharide in a narrow MMW range, and that it is highly dependent on DOT. The role of alginate-lyase (present in the wild type) is restricted to a post-polymerization step.

Introduction

Alginates are exopolysaccharides composed of β -D-mannuronic acid and its C₂ epimer, α -L-guluronic acid, arranged in irregular blocks along a linear chain. They are extracted from several different species of brown algae (Phaeophyta) (Gacesa 1998). Bacterial species, such as the nitrogen-fixing aerobic *Azotobacter vinelandii*, produce alginates. The study of alginate biosynthesis in *A. vinelandii* has biotechnological significance, since alginate is an industrial polymer. From a commercial point of view, one of the most important characteristics of alginate is its intrinsic viscosity, which determines the viscosity of solutions to which it is added. The intrinsic viscosity depends mainly on the molecular weight of the alginate and, to a lesser extent, on its composition (Gacesa 1998).

In *A. vinelandii*, the steps in the pathway leading to the formation of an activated monomeric unit (GDP-mannuronate) have been well characterized. These involve the participation of the products of three genes, *algA*, *algC* and *algD* (Campos et al. 1996; Nuñez et al. 2000). Recently, later steps involved in post-polymerization modifications, such as epimerization, acetylation and depolymerization, have begun to be understood; these involve the gene products of *algE1-7*, *algG*, *algF* and *algL* (Ertesvåg et al. 1996, 1998; Lloret et al. 1996; Rehm et al. 1996; Svanem et al. 1999, 2001; Vazquez et al. 1999; Trujillo-Roldan et al. 2003a). However, intermediate processes in the pathway of alginate biosynthesis, in which intermediaries (monomer or oligomers) have to cross the inner membrane, and how these moieties are polymerized to form polymannuronic acid, are still unknown. The products of the genes *alg8*, *alg44*, *algX* and *algK* (Mejía-Ruiz et al. 1997a, 1997b; Sabra et al. 2001) are candidates for subunits of the alginate polymerase complex. The specific activities of the key enzymes involved in the biosynthesis of alginate by *A. vinelandii* have been determined as being dependent on dissolved oxygen tension (DOT) levels (Horan et al. 1983). Moreover, the production of alginate and the mean molecular weight (MMW) of the polymer depends on DOT (Sabra et al. 1999; Peña et al. 2000).

To our knowledge, no information has been published documenting the possible roles of the polymerase complex and alginate-lyase in determining the MMW and molecular weight distribution (MWD) of the alginate produced under different DOT levels. The aim of this work was to understand how two of the final steps in the biosynthesis of alginate by *A. vinelandii* (polymerization and de-polymerization) determine the molecular characteristics of the polymer under varying conditions of DOT. In order to establish the role (or lack of it) of alginate lyase, we used a mutant

lacking this enzyme (Trujillo-Roldán et al. 2003a) and compared its performance with a wild type strain. As we required that only the strain and the DOT be independent variables, we used washed cells as inoculum as we have previously shown that components in the inoculum affect alginate biosynthesis and its molecular weight (Trujillo-Roldán et al. 2003b).



Materials and methods

Microorganisms and culture conditions

The bacterial strains used in this work were *A. vinelandii* ATCC9046 and the non-polar *algL* mutant SML2 that is unable to produce alginate-lyase, but able to produce alginate. This strain was previously described by Trujillo-Roldán et al. (2003a) and deposited in the Microbial Culture Collection of the Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (Mexico City), with the code BM-B-377. The strains were maintained by monthly subculture on Burk's (Peña et al. 2000) agar slopes, stored at 4°C and, in the case of the mutant, with the addition of gentamicin (2.0 µg/ml).

Submerged cultures were carried out in batch, in a 1.5 l stirred tank (working volume 1.0 l; Virtis, Gardiner, N.Y.) mounted on an Omni-culture support, equipped with two Rushton impellers (ratio of impeller/tank diameter =0.5). DOT measurement and control at 1%, 3% and 5% (respect to air saturation) were conducted by gas blending (N₂ and O₂), using a proportional-integral-derivative control algorithm (Trujillo-Roldán et al. 2001). Measurements and control of pH at 7.2 were made by an on-off control adding NaOH (2.0 M). All fermentations were conducted at 29°C using an agitation rate of 700 rpm and a total gas flow rate of 800 ml/min.

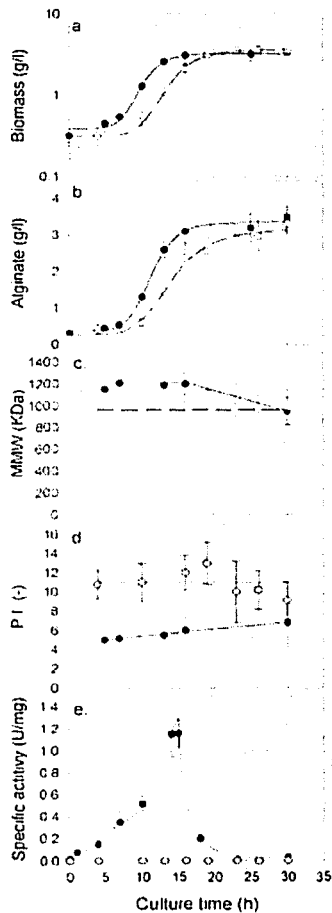
As it has been shown that the exhausted broth components from the inoculum play important regulatory roles in alginate biosynthesis and in determining its molecular weight (Trujillo-Roldán et al. 2003b), washed cells were inoculated to the fermenter as described by Trujillo-Roldán et al. (2003b). The aim of using washed cells as inoculum was to avoid the exhausted inoculum broth components (as extracellular alginate-lyase activity and alginate), in order to properly separate their effects on alginate biosynthesis, mainly in terms of its molecular characteristics.

Analytical determinations

Biomass, alginate and sucrose concentrations were determined as described previously (Peña et al. 2000). MMW and MWD of alginates were estimated by gel-permeation chromatography as

previously reported (Peña et al. 2000). Polydispersity index (PI) was defined as the ratio of MMW (weighting the polymer molecules according to the weight of those having a specific molecular mass) to mean number weight (weighting the molecules according to the number of those having a specific molecular mass). Alginate-lyase activity was measured using a spectrophotometric assay as previously reported by Trujillo-Roldán et al. (2003a). Specific alginate-lyase activity was expressed as the change in absorbance at 235 nm per minute per milligram of soluble extracellular protein. Protein was quantified using a Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, Calif.).

All cultures carried out using the ATCC9046 and SML2 strains were performed in triplicate. Figure 1 shows the mean value of three independent cultures carried out at 3% DOT and the standard deviation among replicas. The differences between the averages of the cultures were evaluated by a student's mean comparative *t*-test ($P=0.05$).



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Fig. 1. Kinetics of biomass growth (a), alginate concentration (b), mean molecular weight (*MMW*) (c), polydispersity index (*PI*) (d), and specific alginate-lyase activity (e) of cultures of *Azotobacter vinelandii* strains ATCC9046 (●) and SML2 (○) carried out at 3% dissolved oxygen tension (DOT)

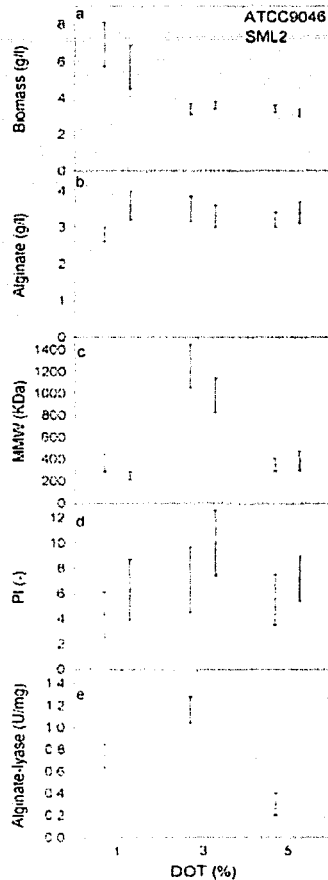
Results

Figure 1a shows typical growth kinetics of cultures of the two strains of *A. vinelandii* (ATCC9046 and SML2) carried out at 3% DOT. The specific growth rate (μ) of SML2 cultures (0.16 h^{-1}) was lower than that of the wild type strain (0.19 h^{-1}). However, both strains reached similar final biomass concentration (3.4 ± 0.3 and $3.6 \pm 0.2 \text{ g/l}$ for ATCC9046 and SML2, respectively). Figure 1b shows the evolution of alginate concentration during the course of the cultures. A similar final alginate concentration was obtained for both strains (3.5 ± 0.3 and $3.3 \pm 0.3 \text{ g/l}$ for ATCC9046 and SML2, respectively). However, slight but significant differences were observed in specific production rates comparing the wild type ($0.056 \text{ galg g}_{\text{biom}}^{-1} \text{ h}^{-1}$) with the mutant ($0.047 \text{ galg g}_{\text{biom}}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Figure 1c shows that higher and constant MMW ($1,250 \pm 200 \text{ kDa}$) alginate was obtained in cultures carried out using the ATCC9046 strain compared with that produced by the SML2 mutant ($985 \pm 160 \text{ kDa}$). However, after 14 h of culture (pre-stationary phase of growth) the alginate from wild type cultures begins to be depolymerized by the action of an alginate-lyase activity (Fig. 1e) and a drop from 1,250 to 980 kDa was observed (Fig. 1c). In SML2 cultures, no depolymerization of alginate was observed and no alginate-lyase activity was detected (Fig. 1c, e). Figure 1d shows that the wild type produces more dispersed families of alginates (higher PI) than those obtained from cultures using the SML2 strain.

The specific alginate-lyase activity of cultures carried out with the ATCC9046 strain increased from the beginning of the culture, reaching a maximum towards the end of the exponential phase of growth. Later, the specific activity decreased to values similar to those present at the beginning of the culture. On the other hand, when the cultures were carried out using the SML2 strain, no alginate-lyase activity was detected (Fig. 1e).

The kinetic behavior of cultures of both strains carried out at 1% and 5% DOT was similar. A comparison of the effect of DOT on cultures of strains SML2 and ATCC9046 is presented in Fig. 2. Maximum biomass concentration was obtained at 1% DOT (Fig. 2a) for both strains ($6.9 \pm 1.2 \text{ g/l}$ and $5.7 \pm 1.2 \text{ g/l}$, for ATCC9046 and SML2, respectively). At 3% and 5% DOT, no significant differences were found between the final biomass concentrations for both strains (around $3.5 \pm 0.4 \text{ g/l}$). Figure 2b shows that for SML2 cultures, there are no significant differences between

the final alginate concentrations (3.5 ± 0.4 g/l), regardless of the DOT level (in the range 1–5% DOT). In contrast, in ATCC9046 cultures alginate production depends on DOT. Final alginate concentrations of 2.8 ± 0.2 , 3.5 ± 0.3 , and 3.2 ± 0.2 g/l were obtained at 1%, 3%, and 5% DOT, respectively (Fig. 2b). In all cultures, sucrose (20 g/l) was completely consumed by the microorganism (data not shown).



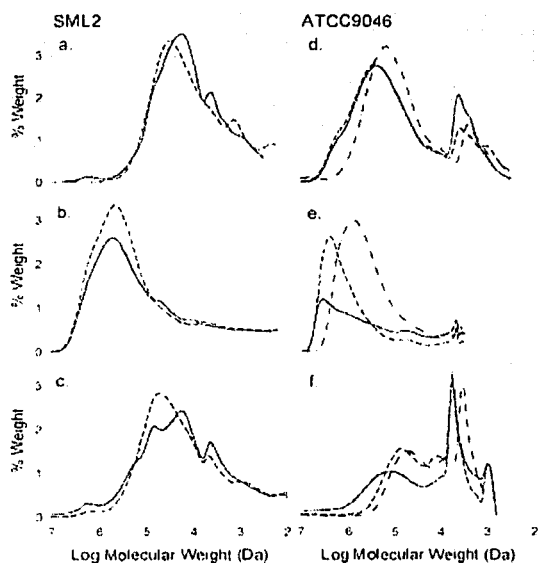
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 2. Effect of DOT on the final biomass (a) and alginate concentration (b), maximum MMW (c) and PI (d) of alginate (before depolymerization) and maximum specific alginate-lyase activity (e) in cultures carried out using strains SML2 and ATCC9046

Figure 2c shows how DOT affects the MMW of the alginate produced in ATCC9046 and SML2 cultures. For the wild type strain, MMW values are those obtained before the alginate begins to be depolymerized by the action of the alginate-lyase. For both strains, the highest MMW was

reached at 3% DOT (compared with 1% and 5%). MMW of $1,250 \pm 200$ and 985 ± 160 kDa were obtained for ATCC9046 cultures and SML2 cultures, respectively. Figure 2d shows that no significant differences were found between the PI of cultures conducted with ATCC9046 and SML2 strains at 1% and 5% DOT. However, at 3% DOT the PI of the alginate produced by the SML2 strain was significantly higher. Figure 2e shows the effect of DOT on the maximum specific alginate-lyase activity. In ATCC-9046 cultures, the maximum of this activity was found in the pre-stationary phase of growth and a drop in alginate-lyase activity was observed in the stationary phase (resembling the trend shown in Fig. 1e for cultures carried out at 3% DOT). On the other hand, no alginate-lyase was detected in SML2 cultures.

Figure 3 shows the MWD of alginates produced at different culture times by *A. vinelandii* SML2 and the wild type under 1, 3 and 5% DOT. The SML2 mutant always synthesizes a similar MWD (with similar MMW) of alginates throughout the cultures carried out at a given DOT and no depolymerization of alginate was observed. *A. vinelandii* ATCC9046 also synthesized similar MWD of alginates (with similar MMW) along the culture at each DOT evaluated. In the stationary phase of growth, a slight shift of the MWD to the right was observed, indicating de-polymerization caused by the action of alginate-lyases.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 3a-f. Molecular weight distribution (MWD) of alginate produced by *A. vinelandii* strains SML2 (a-c) and ATCC9046 (d-f) during cultures carried out at 1%, 3%, or 5% DOT for the times indicated. a 1% DOT: solid line 7 h, dotted line 13 h, dashed line 21 h. b 3% DOT: solid line 7 h, dotted line 13 h, dashed line

16 h. e 5% DOT: *solid line 7 h, dotted line 13 h, dashed line 16 h.* d 1% DOT: *solid line 10 h, dotted line 13 h, dashed line 25 h, dot+dash line 30 h.* e 3% DOT: *solid line 6 h, dotted line 10 h, dashed line 16 h, dot+dash line 25 h.* (f) 5% DOT: *solid line 6 h, dotted line 10 h, dashed line 16 h, dot+dash line 25 h*

Discussion

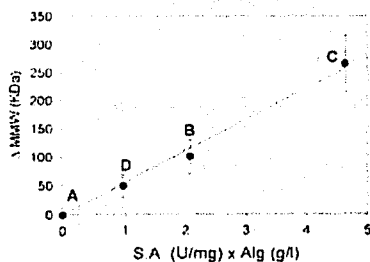
Vázquez et al. (1999) demonstrated that the non-polar insertion of an Ω cassette into the gene *algF* (belonging to the *algXLIVFA* gene cluster) reduced alginate production compared to the wild type strain. Similar results were reported by Trujillo-Roldán et al. (2003a) where the non-polar insertion of the Ω cassette was made in *algL*. As shown in this work, alginate production by the SML2 strain was lower than in the wild type strain. The unique *algL* non-polar mutation could be affecting transcription of *algL* genes downstream (i.e., *algI*, *algV*, *algF* and *algA*), because the transcription of these genes is actually driven by the promoter in the Ω cassette and not by promoters located upstream of *algL*. Changes in transcription of genes downstream of *algL* could be affecting the activity of the bifunctional biosynthetic enzyme AlgA, in a manner similar to that shown for *algA* in *Pseudomonas aeruginosa* (Leitão and Sá-Correia 1997), leading to a slight decrease in alginate production rate in comparison with the wild type strain. On the other hand, the MMW of the alginate (before depolymerization) of the wild type is significantly higher than that of the mutant (Fig. 1c). The decrease in the activity of AlgA could also be affecting the last step of the biosynthesis of alginate (i.e., polymerization).

The final alginate concentration reached using the wild type strain is affected by the culture DOT (Fig. 2b); however, in the cultures carried out using the SML2 mutant, alginate production did not exhibit significant differences with respect to the DOT (within the range 1–5% DOT). Transcription of *algA* (driven by the promoter in the Ω cassette) could be affecting the bifunctional activity of AlgA and the way that the transcription or the activity is affected by DOT. Horan et al. (1983) showed that the dual activity of AlgA in *A. vinelandii* is highly affected by DOT, and Leitão and Sá-Correia (1997) showed that transcription of *algA* is also affected by small DOT changes in *P. aeruginosa*. From the practical point of view, strains of *A. vinelandii* that produce similar amounts of alginate without being affected by small DOT changes (e.g., SML2 strain) would be very convenient if the process is scaled-up (Trujillo-Roldán et al. 2001).

In this work, we report for the first time that polymerization yields families of alginates with very similar MWD (Fig. 3), regardless of culture time. In addition, the MMW of these families is strongly affected by DOT (Figs. 2c, 3), indicating that the polymerase complex is highly affected

by DOT. It is possible that transcription of *alg8*, *alg44*, *algX* or *algK* (as parts of the polymerase complex) is affected by DOT as is the case for *algA*, *algC* and *algD* transcription in *P. aeruginosa* (Leitão and Sá-Correia 1997). It should be pointed out that only by washing the cells used in the inoculum was it possible to observe this phenomenon. Components of the exhausted broth contained in the inoculum are known to play important roles in alginate biosynthesis and in determining its molecular weight (Trujillo-Roldán et al. 2003b). An example is the small quantity of alginate coming from the inoculum and which is added to the fermenter. This alginate is mixed with the alginate produced de novo in the fermenter. Thus, this mixture changes the distribution of the families of alginate and it would be difficult to know which are the molecules of alginate produced in the fermenter and which were pre-synthesized in the inoculum (Trujillo-Roldán et al. 2003b). Moreover, the alginate-lyase activity (from the inoculum) present at the beginning of conventionally inoculated cultures, would also act on alginate molecules as they are synthesized, reducing the MMW and modifying the MWD.

In SML2 cultures, no alginate-lyase activity (Fig. 2e) and no depolymerization of alginate were observed at the end of cultures (Fig. 3a-c), as expected from a non-polar *algL* mutation (Trujillo-Roldán et al. 2003a). On the other hand, in ATCC9046 cultures (for a given DOT), similar MWD were synthesized until the stationary phase of growth (Fig. 3d-f). Thereafter, depolymerization was observed, indicated by a shift of the MWD towards lower MMW. This drop in MMW is strongly correlated with alginate-lyase activity, as this enzyme activity was highest when the drop in MMW began to be evident [as shown in Fig. 1c, as well as for cultures carried out at 1% and 5% DOT (data not shown)]. Data from Fig. 2e also show that the specific alginate-lyase activity depends on the DOT value, being highest at 3% DOT. The higher the specific alginate-lyase activity (Fig. 2e), the higher the drop in the MMW of the alginate (Fig. 3d-f). The maximum specific alginate-lyase activity (Fig. 2e), if multiplied by the final concentration of alginate (Fig. 2b), shows a linear relationship with the drop in MMW (Δ MMW) (Fig. 4) indicating that the Δ MMW can be explained solely by the action of the lyase on its substrate.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 4. Relationship between the drop in the MMW (Δ MMW) of cultures in the stationary phase of growth as a function of the specific alginate-lyase activity and final alginate concentration. Data include information from cultures of *A. vinelandii* SML2 where no degradation of alginate occurred (*A*) and ATCC9046 cultures at different DOT: *B* 1%, *C* 3%, *D* 5%

May and Chakrabarty (1994) proposed that in *P. aeruginosa* the alginate lyase may function either as an editing protein to control the length of the alginate polymer or to provide short pieces of alginate to prime the polymerization reaction. In this study, we have demonstrated that *A. vinelandii* is able to produce a polymer with similar MWD, independently of the culture time. These results suggest that the AlgL protein is not necessary to initiate a polymer chain or to edit the final (maximum) molecular weight of the alginate produced. This task should be restricted to the polymerase itself. The alginate lyase could act to determine the molecular weight after the alginate has been synthesized.

The *A. vinelandii* genome encodes a family of eight epimerases (Rhem et al. 1996; Svanem et al. 1999), two of which display both epimerase and lyase activity (Svanem et al. 1999, 2001). However, using the same analytical methods, no alginate lyase activity was found extracellularly, either in this work in the *algL* mutant cultures, or in previous work in our laboratory (Trujillo-Roldán et al. 2003a). This suggests that if epimerases with alginate-lyase activity were present, we were not able to detect them, and also that these epimerases do not play an important role in the determination of MMW and MWD in DOT-controlled cultures. Moreover, from the relationship shown in Fig. 4, it is possible to conclude that the drop in MMW in ATCC9046 cultures results solely from the action of the extracellular alginate-lyase.

Conclusions

Using a mutant lacking alginate-lyase (SML2) and the wild type (ATCC9046) it was possible to discriminate between the roles of the polymerase complex and alginate-lyase in the determination of the MMW of alginate by *A. vinelandii*. This was possible as we used washed cells as inoculum, which avoided the presence of exhausted broth components. The data suggest that alginate polymerization occurs by making chains of very uniform MWD and low dispersion throughout the culture, regardless of the strain used. Alginate-lyase is not essential for the production of alginate; however, when this enzyme is present (as in the wild type), its role is restricted to a post-polymerization step, with its activity reaching a maximum in the pre-stationary phase of growth. The action of alginate-lyase (AlgL) is evidenced by a drop in the MMW of the alginate

families. Moreover, both processes (polymerization and depolymerization) are highly dependent on DOT.

Acknowledgements This work was partially financed by DGAPA-UNAM (grant IN218201) and CONACyT (grant 39955). M.A. Trujillo-Roldán is indebted to DGEP-UNAM (Ph.D. scholarship) and to Foundation "Francisco José de Caldas" COLCIENCIAS-Colombia (M.Sc. scholarship). The authors thank Alejandra Rodríguez for assistance in conducting some of the cultures and to Dr. Carlos Peña, Dr. Guillermo Gosset and Dr. Gerardo Saucedo for helpful discussions and criticisms.

References

- Campos ME, Martínez-Salazar JM, Lloret L, Moreno S, Núñez C, Espín G, Soberón-Chávez G (1996) Characterization of the gene coding for GDP-mannose dehydrogenase (*algD*) from *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol* 178:1793–1799
- Ertesvåg H, Valla S, Skjåk-Braek G (1996) Genetics and biosynthesis of alginates. *Carbohydr Eur* 14:14–18
- Ertesvåg H, Eriien F, Skjak-Braek G, Rehm BHA, Valla S (1998) Biochemical properties and substrate specificities of a recombinantly produced *Azotobacter vinelandii* alginate lyase. *J Bacteriol* 180:3779–3784
- Gacesa P (1998) Bacterial alginate biosynthesis—recent progress and future prospects. *Microbiology* 114:1133–1143
- Horan NJ, Jarman TR, Dawes EA (1983) Studies on some enzymes of alginic acid biosynthesis in *Azotobacter vinelandii* grown in continuous culture. *J Gen Microbiol* 129:2985–2990
- Leitão JH, Sá-Correia I (1997) Oxygen-dependent upregulation of transcription of alginate genes *algA*, *algC* and *algD* in *Pseudomonas aeruginosa*. *Res Microbiol* 148:37–43
- Lloret L, Barreto R, Campos ME, Martínez-Salazar JM, Moreno S, Espín G, Soberón-Chávez G (1996) Genetic analysis of the transcriptional arrangement of *Azotobacter vinelandii* alginate biosynthetic genes: identification of two promoters. *Mol Microbiol* 21:449–457
- May TB, Chakrabarty AM (1994) *Pseudomonas aeruginosa*: genes and enzymes of alginate synthesis. *Trends Microbiol* 2:151–157
- Mejía-Ruiz H, Guzmán J, Moreno S, Soberón-Chávez G, Espín G (1997a) The *Azotobacter vinelandii* *alg8* and *alg44* genes are essential for alginate synthesis and can be transcribed from an *algD*-independent promoter. *Gene* 199:271–277
- Mejía-Ruiz H, Moreno S, Guzmán J, Nájera R, León R, Soberón-Chávez G, Espín G (1997b) Isolation and characterization of an *Azotobacter vinelandii* *algK* mutant. *FEMS Microbiol Lett* 156:101–106
- Núñez C, Moreno S, Cardenas L, Soberón-Chávez G, Espín G (2000) Inactivation of the *ampDE* operon increases transcription of *algD* and affects morphology and encystment of *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol* 182:4829–4835
- Peña C, Trujillo-Roldán MA, Galindo E (2000) Influence of the dissolved oxygen tension on the polymer molecular weight produced by *Azotobacter vinelandii*. *Enzyme Microb Technol* 27:390–398
- Rehm BH, Ertesvåg H, Valla S (1996) A new *Azotobacter vinelandii* mannuronan C-5 epimerase gene (*algC*) is part of *alg* gene cluster physically organized in a manner similar to that in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 178:5884–5889
- Sabra W, Zeng AP, Sabry S, Omar S, Deckwer WD (1999) Effect of phosphate and oxygen concentrations on alginate production and stoichiometry of metabolism of *Azotobacter vinelandii* under microaerobic conditions. *Appl Microbiol Biotechnol* 52:773–780
- Sabra W, Zeng AP, Deckwer WD (2001) Bacterial alginate: physiology, product quality and process aspects. *Appl Microbiol Biotechnol* 56:315–325

Svanem BI, Skjak-Brack G, Ertesvåg H, Valla S (1999) Cloning and expression of three new *Azotobacter vinelandii* genes closely related to a previously described gene family encoding mannuronan C-5 epimerases. *J Bacteriol* 181:68–77

Svanem BI, Strand WI, Ertesvåg H, Skjak-Brack G, Hasrtmann M, Barbeyron T, Valla S (2001) The catalytic activities of the bifunctional *Azotobacter vinelandii* mannuronan C-5-epimerase and alginate lyase AlgE7 probably originate from the same active site in the enzyme. *J Biol Chem* 276:31542–31550

Trujillo-Roldán MA, Peña C, Ramírez OT, Galindo E (2001) Effect of oscillating dissolved oxygen tension on the production of alginate by *Azotobacter vinelandii*. *Biotechnol Prog* 17:1042–1048

Trujillo-Roldán MA, Moreno S, Galindo E, Espín G (2003a) Alginate production by an *Azotobacter vinelandii* mutant unable to produce alginate lyase. *Appl Microbiol Biotechnol* 60:733–737

Trujillo-Roldán MA, Peña C, Galindo E (2003b) Components in the inoculum determine the kinetics of *Azotobacter vinelandii* cultures and the molecular weight of its alginate. *Biotechnol Lett* 25:1251–1254

Vázquez A, Moreno S, Guzman J, Alvarado A, Espín G (1999) Transcriptional organization of the *Azotobacter vinelandii* *algC.N.A.H.A* genes: characterization of *algI⁻* mutants. *Gene* 232:217–222

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN