

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis



**“ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS PRINCIPALES
COMPONENTES DEL MEDIO DE CULTIVO AGOTADO DE
Azotobacter vinelandii SOBRE LA PRODUCCIÓN DE
ALGINATO Y SU PESO MOLECULAR”**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS
P R E S E N T A :
I.Q. IVETTE PACHECO LEYVA

Tutor: Dr. Carlos F. Peña Malacara

Agosto 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Carlos Felipe Peña Malacara. Durante la realización de este trabajo, se contó con el apoyo económico de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) a través del proyecto IN-230407, así como la beca CONACyT (199916).

La victoria pertenece al más perseverante

Napoleón Bonaparte

*A mi familia:
Lucio, Eva, Claudia,
Orlando, Ma. Eugenia*

A Ivan

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Enrique Galindo Fentanes, por permitir ser parte de su laboratorio.

Al Dr. Carlos F. Peña M., por la dedicación y paciencia para la realización de este trabajo, como para mi persona.

Al comité tutorial: Dra. Cinthia E. Núñez y el Dr. Alfredo Martínez, por las sugerencias durante y después de la realización del trabajo experimental.

Al jurado de examen, por los comentarios hacia este trabajo:

Dra. Elda Guadalupe Espín Ocampo (Presidente)

Dra. Marcela Ayala Aceves (Secretario)

Dra. Amelia Farres Gonzáles-Sarabia (Vocal)

Dr. Guillermo Gosset Lagarda (Suplente)

A la unidad de docencia, Gloria, Maribel y Jalil.

A los grupos del Dr. A. López Munguía, Dr. O. Tonatiuh Ramírez y Dr. R. Vázquez Duhalt, por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo.

Al laboratorio del grupo Galindo: Celia Flores, Conrado, David, Diana, Itzel, Don Javier Dorantes, Juan Carlos, Lety Díaz, Dr. Leobardo Serrano, Lupita, Marco T., Mario Caro, MiguelM, Mode, Myriam, Sol Córdoba, Verónica.

Al triplete organizador de eventos Alvaro, Dany y Eliane por la ayuda y los buenos momentos.

A Alvarito, Antonino, Caspeta, Jimmy, Germán, Lilí y ante todo a William por el baile.

A Alvaro Díaz y Julio C. ¡gracias! por la ayuda.

Al todos mis compañeros del equipo de Plantas por adoptarme (Julio, Noreide, Rosario), a los Thunder por el campeonato, al equipo de Fut por la diversión (Adrián, Enrique B.). Y a las chicas de la “selección Ibt” de voleibol.

Al petite comité, por los momentos tonayan y por la hospitalidad brindada.

A Zuemi y Christian, por la sabrosa sobremesa.

A mis muy entrañables amigos: Brenda, Edna, Fer, Iskra, Maga, Magda, Paty y Sergio principalmente por aguantarme, por la amistad, por las risas, por las comidas amenas, por las aventuras nocturnas y por el préstamo de sus casas. Julio, Mario y Tomy por las risas, la buena vibra y por ser dra. corazón.

A quienes fueron mi apoyo en los momentos de mayor estrés en el proceso de inicio y fin de la maestría, muy agradecida, muy agradecida y muy agradecida.

ÍNDICE GENERAL

	Página
Índice general	i
Índice de figuras	iv
Índice de tablas	vi
Resumen	1
1 Introducción	2
2 Antecedentes	4
2.1 Importancia del inóculo en los cultivos microbianos	4
2.2 Comportamiento de cultivos de <i>A. vinelandii</i> bajo dos formas de inoculación	5
2.2.1 Efectos del sobrenadante en otros modelos biológicos	6
2.2.2 Efecto de los suplementos a cultivos en modelos biológicos	6
2.2.2.1 Efecto de los oligosacáridos de alginato como suplementos en modelos biológicos	6
2.3 Factores de cultivo que intervienen en la producción de alginato	8
2.4 Alginatos	10
2.4.1 Alginatos bacterianos	10
2.4.1.1 <i>Azotobacter vinelandii</i>	10
2.4.1.2 Biosíntesis de alginato por <i>A. vinelandii</i>	11
2.4.2 Estructura y propiedades físicas	14
2.4.3 Aplicación de los alginatos	15
3 Hipótesis y objetivos	17
4 Estrategia experimental	18

5	Materiales y métodos	21
5.1	Cepas	21
5.2	Preservación de las cepas	21
5.3	Cultivos en lote	22
5.3.1	Obtención de inóculos	22
5.3.2	Forma de inoculación	22
5.3.2.1	Separación diferencial del inóculo	22
5.3.3	Cultivos en matraces	23
5.3.4	Cultivos en fermentador	23
5.4	Parámetros cinéticos	25
5.5	Métodos analíticos	27
5.5.1	Determinación de biomasa por gravimetría	27
5.5.2	Determinación de biomasa por turbidimetría	28
5.5.3	Extracción y cuantificación de alginato	29
5.5.4	Determinación de sacarosa	29
5.5.5	Distribución de pesos moleculares	30
5.5.6	Determinación de ácidos urónicos	31
5.5.7	Determinación de proteína extracelular en el sobrenadante	32
6	Resultados y discusión	34
6.1	Papel de las alginasas presentes en el inóculo, sobre la producción de alginato y su peso molecular	34
6.2	Papel del alginato y otros componentes provenientes del inóculo en cultivos de <i>A. vinelandii</i> bajo condiciones controladas de cultivo	40

6.2.1	Influencia del alginato proveniente del inóculo sobre la velocidad de crecimiento en cultivos de <i>A. vinelandii</i>	41
6.2.2	Papel del alginato proveniente del inóculo sobre la producción y peso molecular del polímero sintetizado en cultivos de <i>A. vinelandii</i>	47
6.2.2.1	Peso molecular del polímero sintetizado en cultivos de <i>A. vinelandii</i>	51
6.2.3	Impacto del sobrenadante sobre el consumo de sacarosa en cultivos de <i>A. vinelandii</i>	55
6.3	Corolario	59
7	Conclusiones	60
8	Bibliografía	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
2.1	Biosíntesis de Alginato por <i>A. vinelandii</i>	11
2.2	Enzimas involucradas en la polimerización del alginato, por <i>A. vinelandii</i>	12
2.3	Grupo de genes biosintéticos de alginato y su regulación por el sistema GacA/GacS y σ^E en <i>A. vinelandii</i>	13
2.4	Estructura de los bloques constituyentes del alginato	14
2.5	Formación del modelo “Caja de Huevo” debido a la interacción con iones de Ca^{2+}	15
4.1	Estrategia experimental	19
5.1	Sistema de fermentación, control y adquisición de datos para cultivos	24
5.2	Curva de reacción del proceso	24
5.3	Curva estándar para la determinación de biomasa para la cepa ATCC9046	28
5.4	Curva estándar para la determinación de biomasa para la cepa JG41	28
5.5	Curva estándar para la determinación de biomasa para la cepa SML2	29
5.6	Curva estándar para la determinación de sacarosa	30
5.7	Curva estándar para la determinación de ácidos urónicos	31
5.8	Curva estándar para la determinación de proteína extracelular	32
6.1	Cinéticas de crecimiento en matraces agitados	35
6.2	Producción de alginato y pesos moleculares promedio de cultivos en matraces	37
6.3	Cinéticas de consumo de sacarosa en matraces	38
6.4	Cinéticas de crecimiento y consumo de sacarosa en matraces	39
6.5	Perfil de la tensión de oxígeno disuelto a 3% y pH 7.2, durante los cultivos realizados	41
6.6	Cinética de crecimiento de cultivos de <i>A. vinelandii</i> en fermentador, desarrollados bajo dos formas de inoculación	42

6.7	Cinéticas de crecimiento de cultivos de <i>A. vinelandii</i> desarrollados bajo dos formas de inoculación, y su comparación con los cultivos inoculados sin alginato	43
6.8	Cinéticas de crecimiento en cultivos de <i>A. vinelandii</i> en fermentador, desarrollados bajo dos formas de inoculación, y su comparación con los cultivos inoculados con la fracción <5 kDa del sobrenadante	45
6.9	Cinéticas de crecimiento en cultivos de <i>A. vinelandii</i> en fermentador, desarrollados bajo dos formas de inoculación, y su comparación con los cultivos inoculados con la fracción <100 kDa del sobrenadante	46
6.10	Cinéticas de producción de alginato en cultivos de <i>A. vinelandii</i> en fermentador, desarrollados bajo dos formas de inoculación	48
6.11	Cinéticas de producción de alginato, en cultivos de <i>A. vinelandii</i> en fermentador, desarrollados bajo dos formas de inoculación, y su comparación con los cultivos inoculados con diferentes sobrenadantes	50
6.12	Pesos moleculares promedio de cultivos en fermentador, bajo condiciones controladas de oxígeno disuelto y pH	51
6.13	Pesos moleculares promedio de alginatos de <i>A. vinelandii</i> en cultivos en fermentador, desarrollados bajo dos formas de inoculación, y su comparación con los cultivos inoculados sin alginato	53
6.14	Pesos moleculares promedio de alginatos de <i>A. vinelandii</i> en cultivos en fermentador, desarrollados bajo diferentes formas de inoculación, y su comparación con los cultivos control	55
6.15	Cinética de consumo de sacarosa de <i>A. vinelandii</i> en cultivos en fermentador, 24 h	56
6.16	Cinéticas de consumo de sacarosa de cultivos de <i>A. vinelandii</i> desarrollados bajo dos formas de inoculación, y su comparación con los cultivos inoculados sin alginato	57
6.17	Modelo de acción propuesto para el alginato presente en el inóculo y ausente del inóculo	59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
6.1	Parámetros cinéticos más importantes de los cultivos realizados bajos dos formas de inoculación, y su comparación con los cultivos inoculados sin alginasas, y cultivos inoculados con células resuspendidas	36
6.2	Parámetros cinéticos más importantes de los cultivos realizados bajo dos formas de inoculación, y su comparación con los reportados por Trujillo-Roldán <i>et al.</i> 2003a,b	42
6.3	Parámetros cinéticos más importantes de los cultivos realizados bajos dos formas de inoculación, y su comparación con los cultivos inoculados sin alginato (suplemento mutante)	44
6.4	Parámetros cinéticos más importantes de los cultivos realizados bajos dos formas de inoculación, y su comparación con los cultivos inoculados con las fracciones del sobrenadante de ≤ 100 y ≤ 5 kDa	45
6.5	Parámetros cinéticos más importantes de los cultivos realizados bajo dos formas de inoculación, y su comparación con los reportados por Trujillo-Roldán <i>et al.</i> 2003a	48
6.6	Parámetros cinéticos más importantes de los cultivos realizados bajos dos formas de inoculación, y su comparación con los cultivos inoculados con distintos suplementos	50
6.7	Parámetros cinéticos más importantes de los cultivos realizados bajos dos formas de inoculación, y su comparación con los cultivos inoculados: sin alginato y con la fracción ≤ 100 proveniente del sobrenadante	56

RESUMEN

Los alginatos son copolímeros compuestos de ácido β -D-manurónico y ácido α -L-gulurónico, los cuales son sintetizados por la bacteria *Azotobacter vinelandii*. Estudios recientes sobre la producción de alginato en cultivos de *A. vinelandii*, bajo condiciones controladas de oxígeno disuelto, agitación, temperatura y pH, indican que los componentes en el inóculo regulan la biosíntesis de alginato y definen su peso molecular. Entre estos componentes se encuentran alginatos de diferentes pesos moleculares, proteínas (principalmente alginasas), así como otros componentes no identificados. Por otra parte, en distintos modelos biológicos, se ha observado la participación de oligosacáridos de alginato como activadores del crecimiento y/o reguladores de la respuesta inmune. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto del alginato y alginasas provenientes del inóculo, sobre las cinéticas de crecimiento celular, producción de alginato, consumo de sustrato, así como el efecto en el peso molecular del propio polímero. Para esto, se propuso el manejo de cepas mutantes: una cepa no productora de alginasa AlgL (genotipo SML2) donde no se detecta actividad de alginasa en el sobrenadante del inóculo, y la utilización de una cepa no productora de alginato (genotipo JG41) cuyo sobrenadante del inóculo no contiene alginato. Estos sobrenadantes fueron enfrentados, por separado, a células lavadas de la cepa parental (ATCC9046), donde se evaluó la participación del alginato y la influencia de AlgL. También, se evaluó la participación de oligómeros de alginato provenientes del inóculo, a través de la ultrafiltración diferencial del inóculo de la cepa parental, obteniéndose dos fracciones de cortes moleculares ≤ 100 y ≤ 5 kDa, que fueron añadidas a cultivos con células lavadas de la cepa parental. Los resultados muestran que, el procedimiento de inoculación influye determinadamente en el desempeño de los cultivos de *A. vinelandii*. Por otra parte, las alginasas presentes en el inóculo, no afectan el crecimiento, la producción de alginato ni los pesos moleculares de *A. vinelandii*. El alginato presente en el inóculo, especialmente el polímero con un peso molecular >100 kDa, podría ser el responsable de promover el crecimiento bacteriano y el menor consumo de sustrato en *A. vinelandii*. En los cultivos donde no está presente el alginato en la inoculación (células lavadas y cultivos con el sobrenadante libre de alginato) y aquellos inoculados con fracciones de alginato con peso molecular ≤ 100 kDa del sobrenadante, se observó una disminución en las velocidades de crecimiento y consumo específico de sustrato con respecto al cultivo control, donde se añadió sobrenadante, conteniendo alginatos de distintos pesos moleculares. A diferencia de lo que ocurre con las velocidades de crecimiento y el aumento del consumo de sacarosa, el alginato presente en el inóculo influye negativamente sobre el peso molecular del polímero sintetizado por la bacteria. Así, en los cultivos sin alginato en el inóculo se obtuvieron pesos moleculares mayores (de 100 a 400 kDa) que en aquellos donde existe alginato en el inóculo (50 kDa). Por lo que el alginato pudiese estar actuando como una barrera quelante de un posible activador del peso molecular. Las fracciones de corte molecular ≤ 100 kDa no parecen estar involucradas en la disminución del peso molecular promedio del alginato, ya que éste alcanzó valores similares a los que se obtienen en los cultivos libres de alginato.

I. INTRODUCCIÓN

Los alginatos son exopolisacáridos compuestos de ácido β -D-manurónico y ácido α -L-gulurónico, los cuales son extraídos de diferentes especies de algas pardas (*Phaeophyta*) (Rehm y Valla 1997; Gacesa 1998). También pueden ser obtenidos de bacterias como *Azotobacter vinelandii* y de varias especies de *Pseudomonas* (Conti *et al* 1994; Ertesvåg *et al.* 1996).

Las propiedades físicas de los alginatos son la base de su uso comercial, debido a su capacidad como agentes gelificantes y viscosificantes (Sutherland 1990), ya que aportan una base para la formación de películas, usadas tanto en la protección de alimentos como en la industria textil y farmacéutica. Además, su uso se ha difundido a aplicaciones biotecnológicas principalmente para la inmovilización de células con geles de alginato de calcio (Clementi 1997; Gacesa 1998; Pszczola 1998).

La obtención de alginatos por fermentación es una opción técnica y económicamente factible (Annison y Couperwhite, 1986). Bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Azotobacter* son las únicas fuentes procariotas que producen este polímero. En este contexto, *A. vinelandii* es una bacteria no patógena al ser humano, por lo que constituye una buena opción para la obtención de este producto, además de sintetizar un alginato de características similares al obtenido de algas, lo que representa una ventaja en la producción del alginato (Ertesvåg *et al.* 1996; Galindo *et al.* 2007). Además, el posible manejo de enzimas involucradas en la biosíntesis del polímero abre la posibilidad de manipular las características del alginato con usos potenciales (Ertesvåg *et al.* 1996; Rehm y Valla 1997; Trujillo-Roldán *et al.* 2003b).

Se ha demostrado cómo ciertas condiciones de cultivo de *A. vinelandii* (agitación, oxígeno disuelto, CO₂ y nutrientes) afectan el peso molecular promedio (PMP) y la distribución del peso molecular del alginato (Kennedy *et al.* 1992; Ertesvåg *et al.* 1998; Peña *et al.* 2000; Trujillo-Roldán *et al.* 2001; Seañez *et al.* 2001; Priego *et al.* 2005).

Reportes recientes han revelado cómo los metabolitos generados durante el desarrollo del inóculo, influyen en la producción y las propiedades físicas de los alginatos generados en el cultivo de *A. vinelandii* (Trujillo-Roldán *et al.* 2003a, 2004). Estos estudios sugieren que

los componentes en el inóculo determinan la cinética de producción de alginato y su peso molecular. Sin embargo, en este trabajo no se identificaron los componentes del inóculo que pudieran estar involucrados en dicho fenómeno.

Dentro de los componentes del inóculo de *A. vinelandii* solamente se encuentran descritos aquellos utilizados como producto del cultivos (alginato) y las enzimas que modifican a dicho producto (AlgL) (Trujillo-Roldán *et al.* 2003a; Trujillo-Roldán *et al.* 2004; Galindo *et al.* 2007). Dentro de los múltiples componentes del inóculo de *A. vinelandii* se pueden encontrar alginatos de distintos pesos moleculares, comprendiendo familias de alto, medio y bajo peso molecular. Estas últimas van desde los ≈ 8 kDa, que llamaremos oligosacáridos de alginato. Existen otros componentes del inóculo que comprenden proteínas y azúcares, así como otras tantas moléculas desconocidas.

De los componentes presentes en el inóculo de *A. vinelandii*, los oligosacáridos de alginato han sido empleados como suplementos en algunos cultivos de bacterias, hongos, plantas y células humanas para favorecer la producción de ciertos metabolitos de interés farmacéutico (Otterieri *et al.* 1991).

Por tal razón, el presente proyecto plantea el estudio del efecto de los componentes del medio de cultivo generados en el inóculo en cultivos de *A. vinelandii* sobre la producción y características químicas de los alginatos.

II. ANTECEDENTES

2.1 IMPORTANCIA DEL INÓCULO EN LOS CULTIVOS MICROBIANOS

La inoculación es un procedimiento donde se añaden células para iniciar un cultivo o en el caso de los virus, se añaden virus para el proceso de infección. Para el objetivo de este trabajo, se hablará de cultivos microbianos, donde la inoculación consiste en añadir cierta población de bacterias a medio nutritivo estéril, en el cual se encuentra contenido el sustrato que las células tendrán que degradar o fermentar, para dar como resultado la obtención de algún metabolito de interés. Por lo que el objetivo de todas las fermentaciones *in vitro* es recrear un ambiente dado para cualquier grupo de parámetros determinado y la obtención de al menos un producto.

La importancia del inóculo en los cultivos se debe a que las células deben de estar en las condiciones fisiológicas óptimas, para así poder obtener mayores rendimientos del metabolito que nos interesa. Por tal motivo, al inicio de un cultivo bacteriano es necesario que las bacterias que serán utilizadas en el proceso, sean preparadas para dicho cultivo o fermentación. La preparación de las células microbianas, tradicionalmente ha consistido de tres pasos:

1. Para el primer paso, las bacterias son transferidas del cultivo en preservación donde están contenidas, a otro medio de cultivo sólido donde comienzan a crecer.
2. El segundo paso, consiste en transferir las bacterias de la placa de agar a un matraz, que contiene medio nutritivo estéril (líquido) y es puesto en una placa agitadora dentro de una incubadora. En esta etapa, las bacterias crecen rápidamente debido a la aireación suministrada.
3. El tercer paso, las bacterias provenientes del matraz agitado, pueden ser usadas como “semilla” al ser vertidas en el fermentador, el cual contiene nuevo medio nutritivo estéril.

En nuestro grupo de investigación, se trabaja con la bacteria *A. vinelandii*, la cual produce un polímero extracelular de interés comercial debido a sus propiedades fisicoquímicas. Se sabe que la obtención de alginatos por fermentación es una opción económicamente factible (Galindo *et al.* 2007). Para los cultivos de *A. vinelandii* se ha venido trabajando

con la estrategia de inoculación anteriormente descrita. Hasta hace unos años, fue donde se utilizó una nueva forma de inoculación por nuestro grupo, la cual consistió en una modificación al tercer paso, anteriormente descrito (Trujillo-Roldán *et al.* 2003a). En esta nueva forma de inoculación, las células provenientes del matraz agitado, son separadas del sobrenadante, mediante centrifugación. Así, únicamente las células son utilizadas como “semilla” al ser vertidas al nuevo medio fresco contenido en el fermentador.

2.2 COMPORTAMIENTO DE CULTIVOS DE *Azotobacter vinelandii* BAJO DOS FORMAS DE INOCULACIÓN

Trujillo-Roldán *et al.* (2003a) reportaron el comportamiento de cultivos de la cepa parental de *A. vinelandii* inoculados convencionalmente y con cultivos inoculados con células lavadas, entendiendo por inóculos convencionales aquéllos en donde no se realiza la separación de las células del sobrenadante, esto quiere decir, que todo el material disponible del inóculo es vertido a la fermentación. De tal forma, que en el momento de la inoculación convencional, existen alginatos de distintos pesos moleculares, proteínas, oligosacáridos de ácidos urónicos de bajo peso molecular, así como otros componentes desconocidos y pre-sintetizados en el inóculo. Por otro lado, en los cultivos con inóculos de células lavadas, sólo se agregan células previamente separadas al fermentador, que contiene nuevo medio de cultivo.

A través de esta nueva estrategia de inoculación, Trujillo-Roldán *et al.* (2003a), demostraron que los componentes en el sobrenadante del inóculo pueden regular la biosíntesis del alginato, ya que en los cultivos inoculados con células lavadas se obtuvo una menor concentración final del polímero y pesos moleculares mayores que en los cultivos inoculados convencionalmente. Sin embargo, en estos últimos se observan mayores rendimientos y más altas velocidades de producción de alginato.

Las diferencias observadas por la forma de inoculación (ausencia o presencia del sobrenadante), se evidenciaron en los cultivos con una cepa mutante genotipo AlgL— (SML2). Igualmente, los cultivos fueron inoculados de forma convencional y con células lavadas, en los cuales no se observó diferencia significativa en la concentración final de alginato. Sin embargo, se reprodujo el fenómeno de la obtención de polímero de alto peso

molecular, en cultivos con inoculación con células lavadas, que aquellos con inoculación convencional (Trujillo, 2003).

2.2.1 EFECTOS DEL SOBRENADANTE EN OTROS MODELOS BIOLÓGICOS

Hasta el momento no existen otras evidencias del efecto del sobrenadante en la inoculación en otros modelos biológicos, además del descrito previamente en cultivos de *A. vinelandii*. Tal vez la estrategia más cercana ha sido descrita por Luna *et al.* (2004) donde se reutilizó el sobrenadante del inóculo. Luna *et al.* (2004) reportaron que a través del uso de suplementos, consistiendo en el sobrenadante proveniente del inóculo, se favorece la producción de esporas en cultivos de *B. thuringiensis* var. *israelensis*. Dichos autores, utilizaron como suplemento un sobrenadante resultado de la floculación/sedimentación de la biomasa de la misma bacteria, y lo añadieron al medio de cultivo en concentraciones de 25, 50, 75 % (peso/volumen). Observaron que la producción de esporas se ve favorecida con el uso del 75% (p/v) del sobrenadante, siendo esta producción la mayor obtenida que con otros suplementos empleados.

2.2.2 EFECTO DE LOS SUPLEMENTOS A CULTIVOS EN MODELOS BIOLÓGICOS

Se han reportado métodos alternativos para aumentar el rendimiento en cultivos, mediante suplementos de ciertos factores al medio de cultivo que no actúan como nutrientes o precursores. En algunos cultivos de plantas se ha visto favorecido la producción de ciertos metabolitos de interés farmacéutico, a través de la utilización de ciertos compuestos capaces de inducir un incremento en la producción de dicho metabolito. Estos compuestos pueden ser fragmentos de carbohidratos u oligosacáridos derivados de polisacáridos, de hongos, plantas y bacterias (Otterieri *et al.* 1991).

2.2.2.1 EFECTO DE LOS OLIGOSACÁRIDOS DE ALGINATO COMO SUPLEMENTOS EN MODELOS BIOLÓGICOS

Dentro de los múltiples componentes del inóculo de *A. vinelandii*, podemos encontrar alginatos de distintos pesos moleculares, que en su totalidad equivalen al 1 % (p/v) del material contenido en el inóculo. De la variedad de estas familias de pesos moleculares,

podemos encontrar a los alginatos de bajo peso molecular ≈ 8 kDa, a los que llamaremos oligosacáridos de alginato.

Se ha reportado que estos oligosacáridos de alginato estimulan el crecimiento de *Bifidobacteria*, en medio de cultivo suplementado con 0.4 % (p/v) de alginatos depolimerizados (oligosacáridos) (Akiyama *et al.* 1992). Además, se realizó una comparación con el alginato no depolimerizado, observándose que el alginato sin depolimerizar no estimula en crecimiento de la bacteria. Por otra parte, Brownlee *et al.* (2005), proponen que la utilización de oligosacáridos de alginato (manurónico/gulurónico = 1.5) modula las colonias de microflora del colon, ya que actúa como sustrato para *Bifidobacteria*, reduciendo los niveles de toxinas en el lumen.

En hongos, los oligosacáridos de alginato (oligomanuronato y oligogulurato) si son añadidos al medio de cultivo, resulta en una sobreproducción de metabolitos secundarios como el caso de penicilina G y crisogenina (pigmento amarillo), producidos por *Penicillium chrysogenum* (Ariyo *et al.* 1997; Ariyo *et al.* 1998; Asylonu *et al.* 2000). En el caso de la penicilina G, Ariyo *et al.* (1997), utilizaron oligosacáridos homopoliméricos de manuronatos y guluronatos (bloques OM y OG, respectivamente), con bloques de 9 y 10 residuos. De estos bloques OM y OG se evaluaron diferentes concentraciones encontrándose que, en concentración de 25 $\mu\text{g/mL}$ de bloques de OM añadidos existe un incremento significativo en la producción de penicilina G.

Se ha observado que ciertos oligosacáridos actúan como activadores de moléculas que pueden regular funciones fisiológicas, así como el proceso de defensa en algunas plantas, llamadas oligosacarinas (Bland *et al.* 2004). En plantas, los oligosacáridos de alginato (alrededor de 10 residuos de manuronato y/o guluronato), promueven la germinación y a elongación (p.e. espinaca, tabaco) (Yonemoto *et al.* 1993; Tomoada *et al.* 1994).

Estos oligosacáridos de alginato también han sido usados como un método alternativo para aumentar el rendimiento en cultivos (Otterieri *et al.* 1991; Ariyo *et al.* 1997) y utilizados para fomentar la actividad de monocitos en la producción de citoquinas, las cuales son metabolitos de defensa en humanos (Otterieri *et al.* 1991). Existe un trabajo reportado por Iwamoto *et al.* (2003) donde se observa que los oligómeros de alginato y no los poliuronatos originales, son responsables de la bioactividad evaluada en células

mononucleares humanas. Estos trabajos indican que ciertos oligosacáridos en soluciones pueden tener efectos significativos sobre el metabolismo de células animales y de plantas, resultando en la producción de la molécula que contribuye a la defensa del organismo.

2.3 FACTORES DE CULTIVO QUE INTERVIENEN EN LA PRODUCCIÓN DEL ALGINATO POR FERMENTACIÓN

El alginato producido por *A. vinelandii* se ha estudiado desde los años 80s, donde se describe la producción de alginato en cultivos en lote o en cultivos continuos (Brivonese y Sutherland 1989; Clementi *et al.* 1995; Parente *et al.* 1998; Clementi *et al.* 1999; Galindo *et al.* 2007).

En nuestro laboratorio se ha venido trabajando con distintos parámetros de fermentación como son agitación, tensión de oxígeno disuelto (TOD), velocidad específica de crecimiento, CO₂, nutrientes e inóculo. Se ha observado que ciertas condiciones de cultivo afectan la biosíntesis del alginato y por lo tanto, afectan el peso molecular promedio (PMP, promedio de la masa molecular de todos los alginatos producidos) y la distribución del peso molecular del alginato producido por *A. vinelandii* (familias de distintos pesos moleculares de alginatos). Los cambios han sido evaluados en términos de la velocidades de crecimiento, de la producción de alginato, el consumo de la fuente de carbono, rendimientos y productividades (Peña *et al.* 1997; Trujillo 1999; Peña *et al.* 2000; Seañez *et al.* 2001; Trujillo-Roldán *et al.* 2001; Priego *et al.* 2005).

Se ha observado que la aireación y el mezclado son parámetros críticos para la producción del alginato. Dentro de estos trabajos, Peña *et al.* (1997) llevaron a cabo cultivos de *A. vinelandii* en matraces con baffles, donde las bacterias crecieron casi al doble y produjeron tres veces menos alginato, por lo tanto presentaron menor viscosidad en sus caldos, que aquellos cultivos llevados a cabo en matraces convencionales. En ambos casos se observó que el peso molecular del alginato aumentó con respecto al tiempo de cultivo y posteriormente fue depolimerizado.

Por otra parte, Parente *et al.* (1998) observaron que en cultivos con y sin control de TOD, que la mayor concentración final de alginato (3.8 g/L) fue obtenida en los cultivos llevados a cabo sin control de TOD, donde el oxígeno disuelto osciló entre 2 y 4 % de TOD. En

cultivos en fermentador, Peña *et al.* (2000) reportaron como la TOD (en el intervalo de 0.5 a 5 %) y el mezclado (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 a una TOD del 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). También se observó que a más altas velocidades de aireación (de 300 a 700 rpm) llevados a cabo en cultivos a 3 % de TOD, fué mayor la velocidad de crecimiento y la producción de alginato (Peña *et al.* 2000).

Por su parte, Trujillo- Roldán *et al.* (2001) reportaron el efecto de las oscilaciones de la 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 pudo observar que la amplitud de la oscilación tenía un efecto importante en el PMP del alginato, pero no se obtuvieron alginatos de mayor PMP que el obtenido bajo una TOD constante de 3 % (350 kDa). Al igual que Peña *et al.* (2000), ellos encontraron que la depolimerización del alginato era evidente hacia el final del cultivo debida a la posible actividad liasa presente.

Clementi *et al.* (1997) determinaron cómo la depolimerización del alginato coincide con el agotamiento de nutrientes como la fuente de nitrógeno. A su vez, Priego *et al.* (2005) reportaron que el grado de polimerización se encuentra relacionado con la velocidad específica de crecimiento, y en ciertos casos con los rendimientos alginato/biomasa y alginato/sacarosa, en cultivos bajo condiciones de limitación de crecimiento. Este efecto se encuentra más marcado a muy bajas velocidades de crecimiento ($\mu = 0.03 \text{ h}^{-1}$) donde los rendimientos se incrementan por arriba del doble, que aquéllos donde se presentan μ de 0.21 h^{-1} (como las reportadas en matraces convencionales).

Sabra *et al.* (1999) proponen que la fuente de fosfatos es el factor nutricional relacionado con la caída del PMP del alginato en cultivo. Ertesvåg *et al.* (1998) y Kennedy *et al.* (1992) relacionan la degradación del polímero por la acción de la alginasa al final del cultivo, donde la alginasa presenta una alta afinidad por los enlaces de residuos de ácidos manurónicos y muy poca sobre las cadenas de residuos de ácidos gulurónicos.

2.4 ALGINATOS

Actualmente los alginatos son extraídos de fuentes naturales como son las algas, en donde se distinguen principalmente: *Ascophyllum nodosum*, *Laminaria digitata*, *Macrocystis pyrifera*, *Dictyosiphon* y *Foeniculaceus*. La obtención de estos polímeros depende de las condiciones de producción y extracción, tales como: purificación, bajos rendimientos de extracción, fluctuaciones estacionales y alto contenido de impurezas (Annison y Couperwhite, 1986; Sabra *et al.* 2001).

Bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Azotobacter* son las únicas fuentes procariotas que producen este polímero. En este contexto, *Azotobacter vinelandii* constituye una buena opción para la obtención de este producto, por sintetizar un alginato de características similares al obtenido de algas, y además, por ser una bacteria inocua, a diferencia de especies de *Pseudomonas* que son patógenas (Ertesvåg *et al.* 1996).

2.4.1 ALGINATOS BACTERIANOS

2.4.1.1 *Azotobacter vinelandii*

Azotobacter vinelandii es una bacteria clasificada como gram-negativa, de característica mucoide, natural del suelo y aerobia estricta. Su movilidad la realiza a través de sus flagelos peritricos y posee la capacidad de fijar nitrógeno del ambiente (Kennedy, 1987).

Los productos de importancia comercial en los cultivos de *A. vinelandii* son el alginato y un polímero intracelular de reserva, el polihidroxibutirato (PHB). Las condiciones óptimas para la producción de PHB usualmente incluyen un exceso de fuentes de carbono y bajos valores de oxígeno disuelto (Peña *et al.* 2000). Bajo estas condiciones se puede obtener hasta un 70 % de PHB en peso seco de las células (Brivonese y Sutherland, 1989). Se ha descrito que tanto el proceso de síntesis de alginato como el de PHB están asociados al proceso de enquistamiento, el cual genera células esféricas y latentes, resistentes a la desecación (Kennedy, 1987).

2.4.1.2 BIOSÍNTESIS DE ALGINATO POR *A. vinelandii*

La ruta biosintética del 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). Los pasos biosintéticos en la producción de alginato en *A. vinelandii* y *P. aeruginosa* son muy similares (Lyn y Sokatch, 1984; Ertesvåg, *et al.* 1996). *A. vinelandii* utiliza la fuente de carbono mediante la vía de Entner-Doudoroff, el ciclo de las pentosas y ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA), para formar los compuestos intermediarios cuya finalidad es sintetizar los monómeros que conforman el alginato, así como sustancias para su crecimiento y desarrollo (Fig. 2.1).

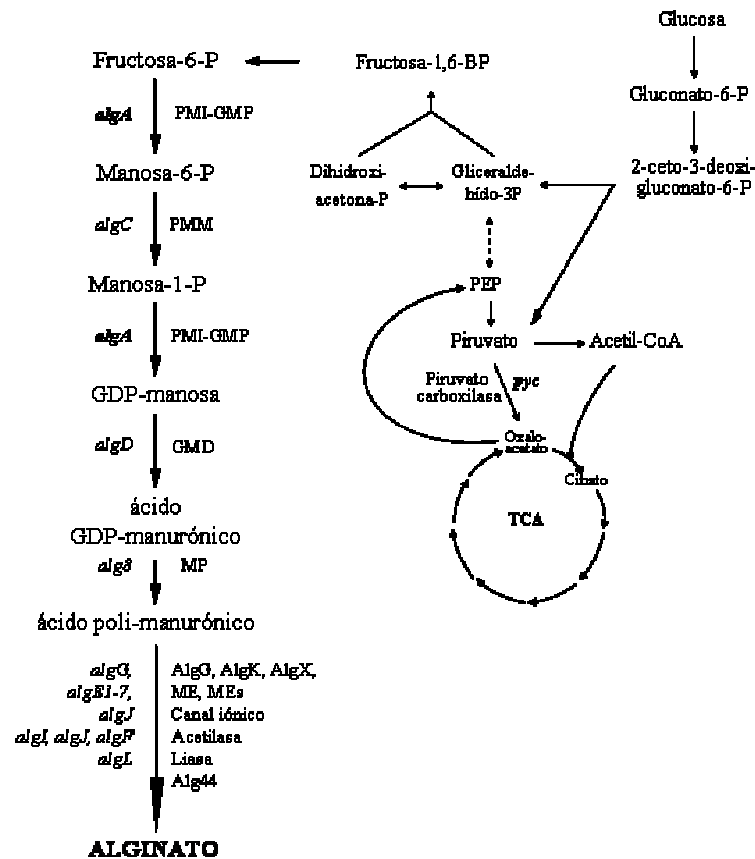


Figura 2. 1. Biosíntesis de alginato por *A. vinelandii*, modificado de Galindo *et al.* (2007).

A grandes rasgos, el alginato es sintetizado a partir de fructosa-6-fosfato, el cual es isomerizado por la enzima bifuncional fosfomanosa isomerasa/guanosin difosfomanosa pirofosforilasa (AlgA), para producir manosa-6-fosfato, la cual es convertida por fosfomanosamutasa (AlgC) en manosa-1-fosfato. AlgA cataliza la conversión de manosa-1-fosfato en GDP-manosa, la cual es oxidada por la enzima GDP-manosa deshidrogenasa

(AlgD), obteniendo ácido GDP-manurónico. La polimerización del ácido GDP-manurónico es llevada a cabo por la enzima Alg8 (manuronato polimerasa). La molécula resultante del paso anterior es modificada por un complejo acetilasa, el cual está comprendido por las proteínas AlgI, AlgV y ALgF, y algunos de los residuos no acetilados son epimerizados a guluronato por una manuronato epimerasa (AlgG), para posteriormente ser transportados a través de la membrana externa por medio de AlgJ (porina) (Remminghorst *et al.* 2006; Galindo *et al.* 2007) (Fig. 2.1).

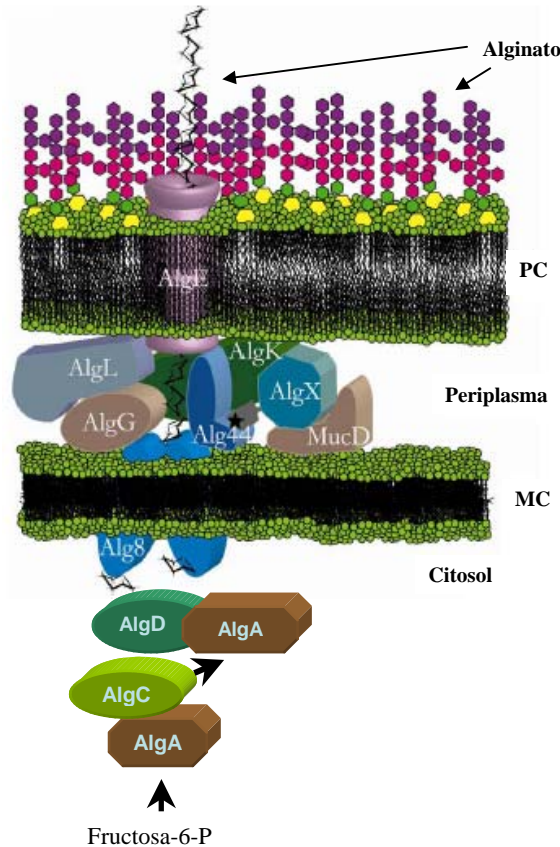


Figura 2.2. Enzimas involucradas en la polimerización del alginato por *A. vinelandii*, modificado de Remminghorst *et al.* (2006).

El polímero exportado es convertido finalmente en alginato por una familia de siete manuronato epimerasas, AlgE1-7. Las proteínas AlgG, AlgK, AlgX y AlgL forman el complejo polimera, el cual guía el polímero a través del periplasma hacia el espacio extracelular. AlgL es la enzima degradadora del alginato, ya que hidroliza al polímero. Actualmente se considera a Alg44 como parte del complejo periplásmico (AlgG, AlgK, AlgX, AlgL) o ayudando a fijar Alg8 en la membrana citoplásmica con AlgJ (Remminghorst *et al.* 2006; Galindo *et al.* 2007) (Fig. 2.2).

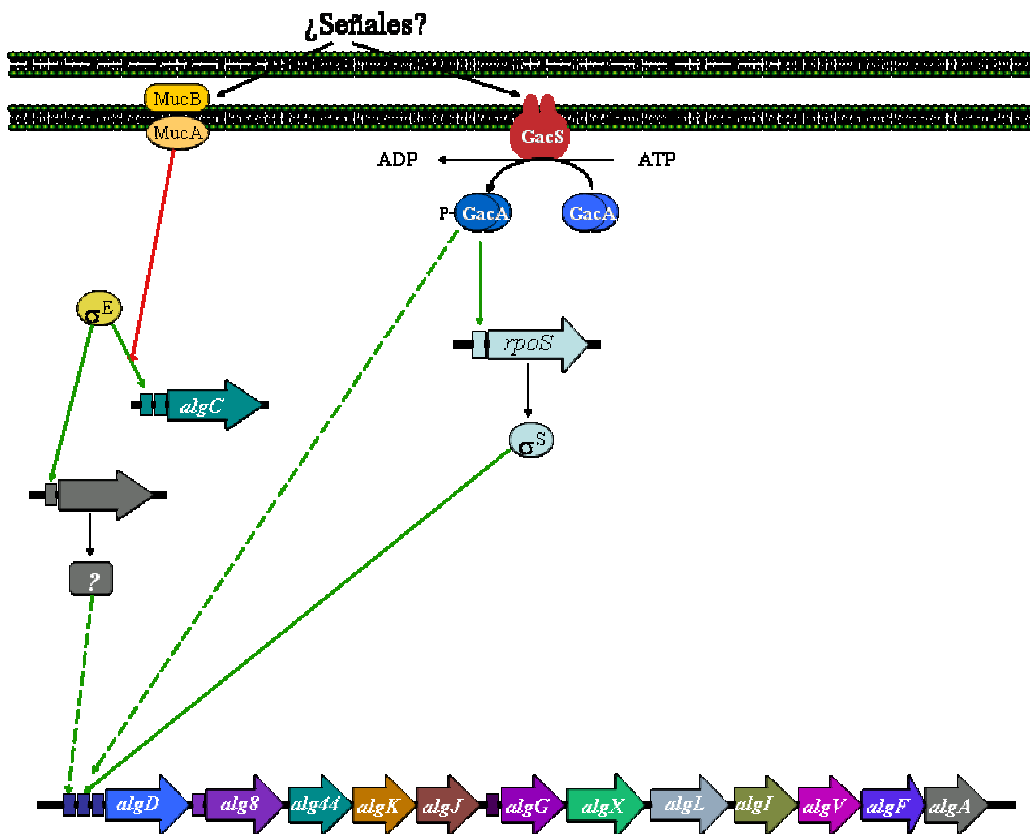


Figura 2.3. Grupo de genes biosintéticos de alginato y su regulación por el sistema GacA/GacS y σ^E en *A. vinelandii*, modificado de Galindo *et al.* (2007).

Los genes que codifican para las enzimas de la ruta biosintética del alginato (Fig. 2.3), conforman el complejo *algD-8-44-K-J-G-X-L-I-V-F-A*, a excepción de *algC*. Diversos promotores transcriben los genes encargados de la biosíntesis del alginato. Existen tres promotores localizados río arriba de *algD*: *algDp1*, *algDp2* y *algDp3*; *alg8p* se encuentra río arriba de *alg8*, y un promotor del factor sigma 70 localizado río arriba de *algG*. Se localizan dos promotores *algCp1* y *algCp2* río arriba de *algC*. Por otra parte, la regulación de la expresión de los genes biosintéticos se encuentra bajo el control del complejo *algUmucABCD*, donde *algU* codifica para el factor alternativo sigma E, necesario para la transcripción de los promotores *algCp1* y *algCp2*. Las proteínas que actúan como factores antisigmas son MucA y MucB. La expresión de los promotores *algD* se encuentran bajo el control de dos componentes del sistema regulador global GacS-GacA, donde GacS actúa como proteína sensora (histidina quinasa) fosforilando a GacA la proteína de respuesta. GacA-P activa la cascada de regulación transcripcional sobre el gen *rpoS*, el cual codifica para el factor sigma S. Dicha cascada de regulación controla la transcripción de *algD* (Remminghorst *et al.* 2006; Galindo *et al.* 2007) (Fig. 2.3).

2.4.2 ESTRUCTURA Y PROPIEDADES FÍSICAS

Los alginatos que se obtienen de las algas marinas y bacterias, son una familia de copolímeros constituidos por ácidos β -D-manurónico (M) y su epímero α -L-gulurónico (G), unidos por enlaces β -1-4 (Rehm y Valla, 1997), variando ampliamente su composición y la secuencia en su estructura, dependiendo de la especie productora, de las condiciones de cultivo y procesamiento de obtención del biopolímero (Sutherland 1990; Gacesa 1998).

Los alginatos producidos por *Azotobacter vinelandii* son similares a los que se obtienen de las algas. Las variaciones en las secuencias en la cadena de alginato en los bloques MG, la longitud y la frecuencia de bloques G son características de alginatos producidos por el género *Azotobacter* (Skjåk-Bræk, 1992; Ertesvåg *et al.* 1996; Skjåk-Bræk y Espevik 1996). Además, a diferencia de los alginatos de algas, los alginatos bacterianos se encuentran acetilados en el carbono dos o tres, en donde el alginato producido por *A. vinelandii* presenta por cada 5.2 residuos de ácidos urónicos, 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 *Pseudomonas aeruginosa* no tiene bloques gulurónicos, lo que determina en gran parte las propiedades del producto (Sutherland 1990; Gacesa 1998) (Fig. 2.4).

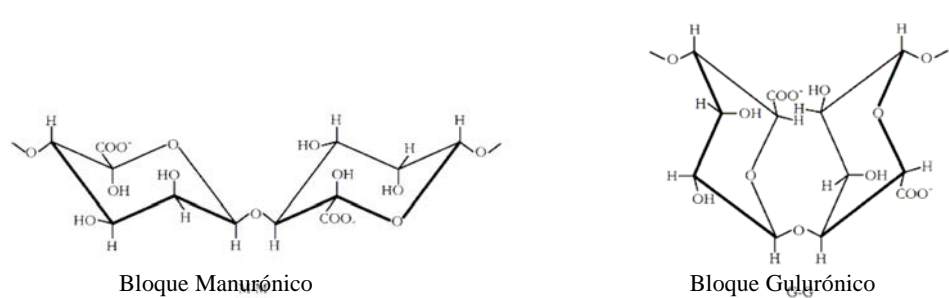


Figura 2.4. Estructura de los bloques constituyentes del alginato.

Desde un punto de vista de la explotación comercial del alginato, las características más importantes de este polímero son la viscosidad y su capacidad para formar geles, en soluciones en donde son contenidos. Estas capacidades dependen de arreglos en los monómeros, así como de la longitud de la cadena del polímero, ya que modifican las propiedades funcionales de los alginatos.

Cuando en el polímero predominan los bloques de ácidos gulurónicos, el gel formado se vuelve rígido y se ha demostrado el aumento en la rigidez del gel con la presencia de iones de calcio –modelo caja de huevo- (Fig. 2.5). Esta rigidez de los geles de calcio, depende del número de enlaces formados entre las cadenas, del tipo de enlace, iones y de la longitud de los bloques entre los enlaces (Sutherland 1990; Rhem y Valla 1997; Clementi 1997). La viscosidad es función principalmente del tamaño molecular (Moe *et al.* 1995), y por lo tanto del peso molecular del polímero, así como de la polidispersidad de su masa molecular. El peso molecular promedio del polímero se encuentra definido como el promedio de la masa molecular de todos los alginatos producidos en un cultivo y el índice de polidispersión (IP), refleja la distribución de pesos moleculares, es decir, la dispersión de las familias de moléculas de los alginatos, ya que existe una mezcla de cadenas con diferentes pesos moleculares en la muestra (Cárdenas 1997; Clementi *et al.* 1998).

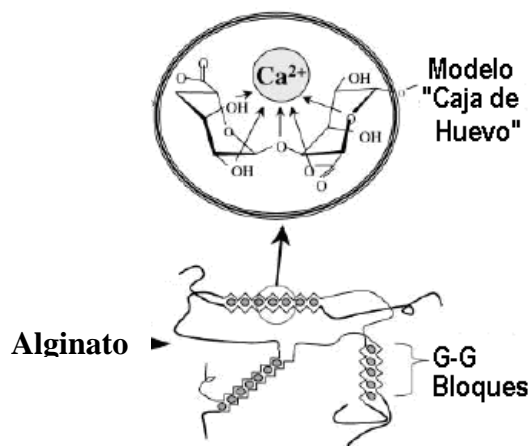


Figura 2.5. Formación del modelo “Caja de Huevo” debido a la interacción con iones de Ca²⁺.

2.4.3 APLICACIÓN DE LOS ALGINATOS

Los alginatos son principalmente usados en la industria como agentes gelificantes y viscosificantes, formadores de películas para la protección de alimentos, estabilizantes y espesantes (Tinoco 1993; Gacesa 1998). La importancia de los alginatos radica en su capacidad para modificar las propiedades reológicas de los sistemas acuosos donde son contenidos (Sutherland 1990). En la actualidad se producen entre 35,000 y 40,000 toneladas de alginato con fines comerciales (Boswell 2002). El precio en el mercado del alginato oscila entre los 4 y 10 dólares por kilogramo. Sin embargo, alginatos de alta

calidad y pureza, usados en la industria farmacéutica alcanzan precios de hasta 40,000 dólares por kilogramo (Boswell 2002).

En la industria textil o papelera, los alginatos ayudan a mejorar la adhesión de colorantes, ya que modifica las propiedades superficiales de la ropa y papel (Sutherland 1990). En la industria farmacéutica se usan para formar emulsiones estables e impresiones dentales (Skjåk-Bræk 1992; Clementi 1997). En medicina, los alginatos de alta calidad se usan para la inmovilización de enzimas (β) del páncreas en cápsulas de este polímero, lo que permite el tratamiento de diabetes tipo I, ya que funciona como páncreas artificial (Otterlei *et al.* 1991). Además, se ha reportado también que los alginatos estimulan el sistema inmunológico a través de monocitos, ayudándoles a secretar citocinas, en la expresión de interleucinas y factores α en necrosis tumorales (Otterlei *et al.* 1991; Iwamoto *et al.* 2003). Por otra parte, Brownlee *et al.* (2005), proponen la utilización de 7.5 g de alginato por día, como fuente de fibra en una dieta balanceada. De acuerdo a estos autores la utilización de alginato (M/G 1.5) reduce la absorción intestinal (desacelera la digestión y absorción de nutrientes, por lo que disminuye los niveles de colesterol sérico), incrementa la saciedad, reduce el daño potencial provocado por contenidos gastrointestinales lumbales (absorción de toxinas, mutagénicos, carcinogénicos) y modula las colonias de microflora del colon (actúa como sustrato para *bifidobacterias*, reduciendo los niveles de toxinas en el lumen).

Una de las aplicaciones biotecnológicas de los alginatos es su uso en la inmovilización de células vivas de diferentes tipos. Por ejemplo, el alginato es usado como biocatalizador en varios procesos industriales, tales como la producción de etanol por células de levadura, o la producción de anticuerpos monoclonales por hibridomas (Skjåk-Bræk 1992; Crescenzi, 1995; Clementi 1997; Pszczola 1998). Los alginatos también se usan en el tratamiento de aguas, ayudando a incrementar la agregación de bacterias en procesos de floculación (Rhem y Valla 1997).

Una de las ventajas de la producción de alginato por medio de bacterias como *A. vinelandii* es que los alginatos presentan una diversidad estructural con respecto a su composición química, ya que se pueden obtener los copolímeros constituyentes puros (Rehm y Valla 1997). El posible manejo de enzimas involucradas en la biosíntesis del polímero abre la posibilidad de manipular las características del alginato con usos potenciales médicos así como biotecnológicos (Ertesvåg *et al.* 1996; Rehm y Valla 1997).

III. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto del alginato y alginasas provenientes del inóculo en cultivos de *A. vinelandii*, sobre la cinética de crecimiento, consumo de sustrato, producción de alginato y su peso molecular.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar el posible efecto de la alginasa AlgL presente en el inóculo en cultivos de *A. vinelandii*, sobre la síntesis de alginato y su peso molecular, mediante el uso del sobrenadante proveniente de una cepa mutante no productora de alginasas (SML2)
- Evaluar el posible efecto del alginato presente en el inóculo en cultivos de *A. vinelandii*, sobre la síntesis de alginato y su peso molecular, mediante el uso del sobrenadante proveniente de una cepa mutante no productora de alginato (JG41)
- Evaluar la influencia de fracciones de diferentes cortes moleculares, provenientes del inóculo, sobre la síntesis de alginato y su peso molecular en cultivos de *A. vinelandii*.

HIPÓTESIS

Los oligosacáridos de alginato así como alginasas presentes en el inóculo, regulan la síntesis de alginato de alto peso molecular en cultivos de *Azotobacter vinelandii*.

IV. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

El objetivo del presente proyecto, es el estudio del efecto de los principales componentes del inóculo de *A. vinelandii*, sobre la producción y características fisicoquímicas de los alginatos. Para ello, se plantea la estrategia experimental, descrita en la figura 4.1.

En la primera etapa del trabajo, se planteó utilizar la cepa parental (ATCC9046) y dos cepas mutantes de *Azotobacter vinelandii*: la SML2, con la particularidad de no producir alginasa AlgL (Liasa —) y JG41, cepa no productora de alginato (Alginato —). De cada una de las tres cepas descritas anteriormente, se obtuvieron los respectivos inóculos (24 h de cultivo en matraces). Se procedió a separar cada inóculo en células (C_x) y sobrenadante (S_y), por medio de la centrifugación de los inóculos. De las cepas mutantes únicamente se utilizaron los sobrenadantes y de la cepa parental se utilizaron células (C_p) y sobrenadante (S_p).

Para evaluar la participación de las alginato liasas presentes en el sobrenadante al inicio de la fermentación, se utilizaron células lavadas de la cepa parental (C_p) y el sobrenadante proveniente de la cepa SML2 (S_{SML2}). Éstos se inocularon a medio fresco Burk y llevados a cabo en matraces agitados de 500 ml de volumen total y 100 ml de llenado, incubados por 72 h, a 200 rpm y 29°C, sin control de oxígeno disuelto en el medio ni pH. Los cultivos se realizaron por triplicado.

De la misma manera, descrita anteriormente, se evaluó la participación del alginato presente en el inóculo, a través de la utilización de la cepa mutante JG41 no productora de alginato. De esta cepa, se utilizó el sobrenadante, S_{JG41} , y células lavadas de la cepa parental (C_p), para obtener cultivos con suplemento libre de alginato, ($C_p + S_{JG41}$). Estos cultivos fueron realizados en fermentador de 3 L con 2 L de medio de trabajo, a 29°C, 700 rpm, pH 7.2 y a 3 % de oxígeno disuelto. Estos cultivos fueron realizados por duplicado.

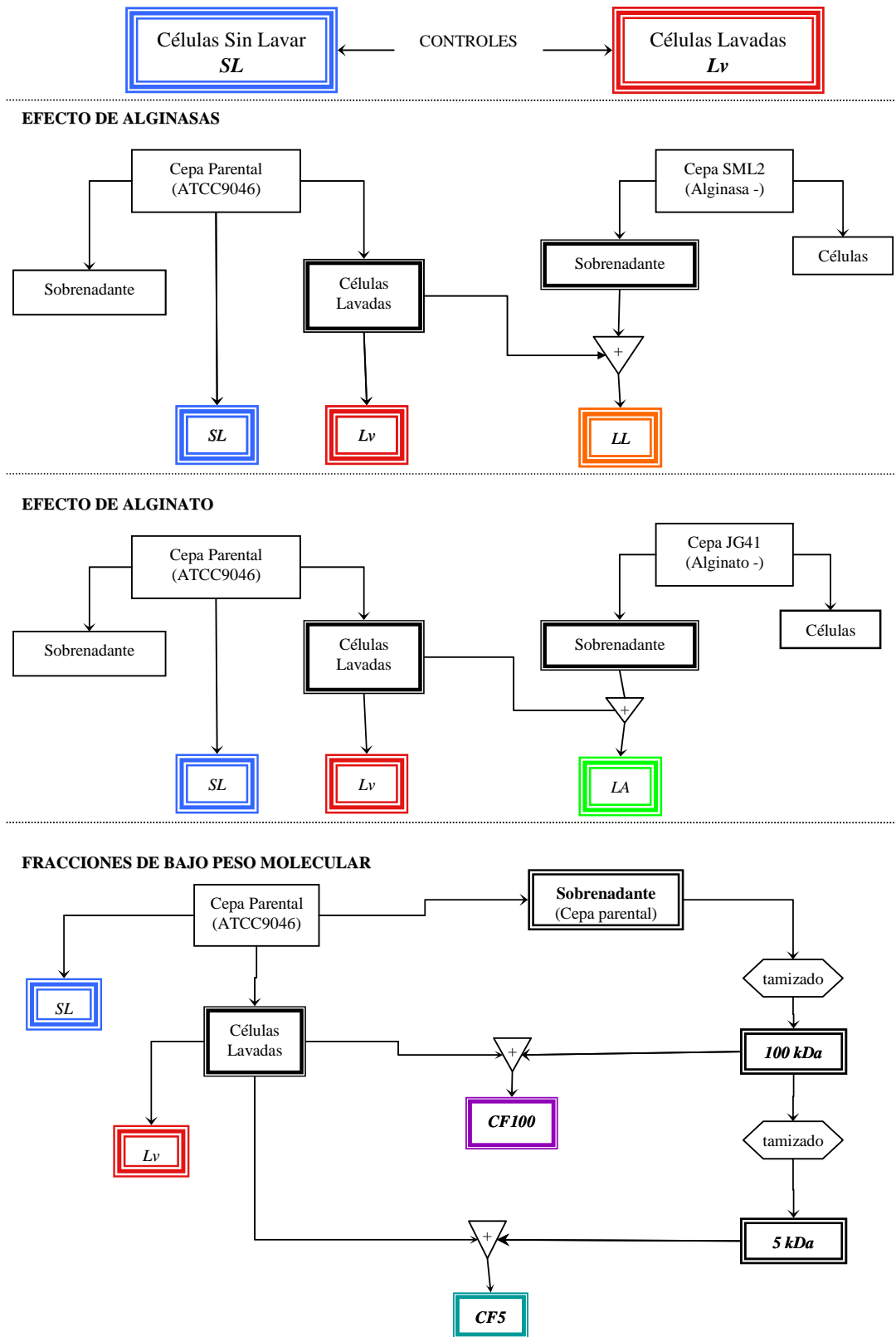


Figura 4.1. Estrategia experimental

Para evaluar el posible efecto de los oligosacáridos de alginato, presentes en el inóculo, se realizó una separación diferencial del sobrenadante de la cepa parental (C_p). Esta separación se efectuó por medio del uso de membranas de ultrafiltración de dos cortes moleculares. De esta manera se obtuvieron fracciones del sobrenadante de <100 kDa y la fracción <5 kDa. Una vez aisladas estas fracciones se procedió a inocular el biorreactor, añadiéndolas por separado, a cultivos con células lavadas de la cepa parental (C_p). Los cultivos se realizaron bajo condiciones controladas y procediendo al respectivo análisis tanto de las cinéticas de producción así como del peso molecular del polímero obtenido. Estos experimentos se realizaron por duplicado.

Los cultivos control para todos los casos fueron realizados con la cepa parental ATCC9046. En el control positivo, se inocularon células sin lavar ($C_p + S_p$), es decir, el inóculo no fue sometido a separación. Por otra parte, como control negativo se inocularon únicamente células lavadas al nuevo medio fresco Burk ($C_p +$ nuevo medio). En ambas condiciones los cultivos se realizaron por duplicado.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 CEPAS

Para este trabajo se realizaron cultivos adicionados con medio de cultivo agotado proveniente de tres cepas de *A. vinelandii*, parental (ATCC9046), liasa — (SML2) y alginato — (JG41).

La cepa alginato — (JG41) es derivada de la cepa parental ATCC9046 con una mutación en el gen *algA*, el cual codifica para la enzima bifuncional fosfomanosa isomerasa-guanosin difosfomanosa isomerasa que cataliza el primer y tercer paso en la vía de biosíntesis del alginato. Cuenta con un cassette de resistencia a gentamicina (Segura *et al.* 2003).

La cepa liasa — es derivada de la cepa parental ATCC9046 y presenta una mutación en el gen *algL*, el cual codifica para la actividad alginato liasa y que forma parte del operón *algGXLIVFA*, el cual codifica para genes relacionados con la biosíntesis del alginato en *A. vinelandii* (Trujillo-Roldán *et al.* 2003b).

5.2 PRESERVACIÓN DE CEPAS

Las cepas de *Azotobacter vinelandii* ATCC 9046 se preservaron en tubos inclinados (slants) con medio Burk modificado con la siguiente composición: 20 g L⁻¹ de sacarosa, 660 mg L⁻¹ de K₂PO₄, 160 mg L⁻¹ de KH₂PO₄, 1.42 g L⁻¹ de MOPS, 50 mg L⁻¹ de CaSO₄·2H₂O, 200 mg L⁻¹ de NaCl, 200 mg L⁻¹ de MgSO₄·7H₂O, 27 mg L⁻¹ de FeSO₄·7H₂O, 2.9 mg L⁻¹ de NaMoO₄·2H₂O, solidificado con agar (18 g L⁻¹), a 4°C, sin extracto de levadura. Se realizaron resiembras mensualmente para su mantenimiento. El pH del medio de cultivo se ajustó a 7.2 con NaOH 2 N y se esterilizó durante 20 min a 120 °C (Peña *et al.* 1997).

Las cepas *A. vinelandii* SML2 (no productora de enzimas degradadoras de alginato) y *A. vinelandii* JG41 (no productora de alginato), se cultivaron en el mismo medio, agregando el antibiótico gentamicina (0.3 µg ml⁻¹) (Segura *et al.* 2003).

5.3 CULTIVOS EN LOTE

5.3.1 OBTENCIÓN DE INÓCULOS

Para la obtención de inóculos se sembraron las cepas *A. vinelandii* ATCC9046, SML2 y JG41, de los *slants* a medio sólido (cajas Petri) y se incubaron a 29°C durante 72 h. Tres asadas de las células de la placa fueron usadas para inocular matraces convencionales (por triplicado) (matraces de 500 mL, con un volumen de trabajo de 100 mL), con medio Burk modificado sin agar, adicionando extracto de levadura (3 g/L), los cuales se incubaron durante 24 h a 29 °C a una velocidad de agitación de 200 rpm.

Se seleccionaron los matraces que presentaron valores de absorbancia de 0.1 (en diluciones 1:50) equivalente a una concentración de biomasa ~ 0.3 g/L, los cuales fueron usados como inóculo para los cultivos en fermentador y en matraces convencionales.

5.3.2 FORMAS DE INOCULACIÓN

Se realizó la separación del medio de cultivo de las células en todas las cepas, por medio de centrifugación a 15,500 g durante 25 minutos (centrífuga Eppendorf 5804). Se obtuvieron dos fracciones: células (C_x) y sobrenadante (S_y). Se utilizaron siempre células (C_p) de la cepa parental de *A. vinelandii* (ATCC 9046) para la inoculación de los matraces convencionales y fermentador. Para obtener el volumen final necesario de inoculación (~ 10 % del volumen final de fermentación), se agregó sobrenadante (S_y), ya sea de las tres cepas de *A. vinelandii* (ATCC 9046, SML2 ó JG41) o de las fracciones del sobrenadante sometidas a ultrafiltración, según sea el caso.

5.3.2.1. SEPARACIÓN DIFERENCIAL DEL INÓCULO

Para la obtención de las fracciones por medio de ultrafiltración, el sobrenadante (S_p) resultante de la sedimentación de las células (C_p), se filtró a través de membranas de celulosa regenerada de 76 mm de diámetro. Las membranas empleadas fueron de dos cortes moleculares: de 100 kDa y 5 kDa (Ultracel YM ultrafiltration discs), en un sistema de ultrafiltración AMICON, Millipore de 400 ml de volumen total y presión máxima de

<55 psi. Se utilizaron condiciones de trabajo de 200 ml de volumen de medio a filtrar, con una presión de 20 psi, utilizando aire.

5.3.3 CULTIVOS EN MATRACES

Los cultivos en lote realizados en matraces se realizaron en matraces Erlenmeyer convencionales de 500 mL, con un volumen de trabajo de 100 mL, con una velocidad de agitación de 200 rpm. Los cultivos se desarrollaron a 29°C, sin control de la tensión de oxígeno disuelto (TOD), ni del pH.

5.3.4 CULTIVOS EN FERMENTADOR

Adicionalmente, se llevaron a cabo cultivos en un fermentador *Applikon* (Holland) de 3 L, con un volumen de trabajo de 2 L, con dos turbinas Rushton (diámetro impulsor/diámetro tanque = 0.35), de 6 paletas planas y un difusor de 7 orificios para aireación por burbujeo. El pH fue controlado a 7.2 de forma *on-off*, adicionando automáticamente NaOH 2 N, usando un amplificador-controlador de pH (*Ingold* 2300, Columbus OH). La tensión de oxígeno disuelto (TOD) fue determinada mediante un electrodo polarográfico de oxígeno (Metter-Toledo, Columbus OH). La señal del electrodo fue transmitida a un amplificador de oxígeno (*Ingold*, Columbus OH) y los datos fueron adquiridos en una PC Compaq Deskpro. La TOD fue controlada en línea utilizando un programa de control en *LabView*, se mantuvo constante al 3 % mediante la manipulación de la presión parcial de nitrógeno y oxígeno en la alimentación, realizado por un controlador de flujo másico (*Brooks Instruments* 0154E), por medio de un algoritmo de control proporcional-integral-derivativo (PID). Los cultivos se crecieron a 29 °C y con una velocidad de agitación de 700 rpm (Peña *et al.* 2000; Trujillo-Roldán, 2001). En la figura 5.1 se describe el sistema de fermentación utilizado para el desarrollo de los cultivos.

El cálculo de las constantes de control a utilizar en la producción de alginato con *A. vinelandii*, se realizó a través del método de la curva de reacción del proceso, propuesto por Ziegler-Nichols (1942) y modificado por Cohen-Coon (1953), el cual es un método *open loop* (ciclo de control abierto). Los cambios infinitesimales en la magnitud de la variable son introducidos al ciclo de control abierto y la respuesta en la variable medida son registrados con respecto al tiempo.

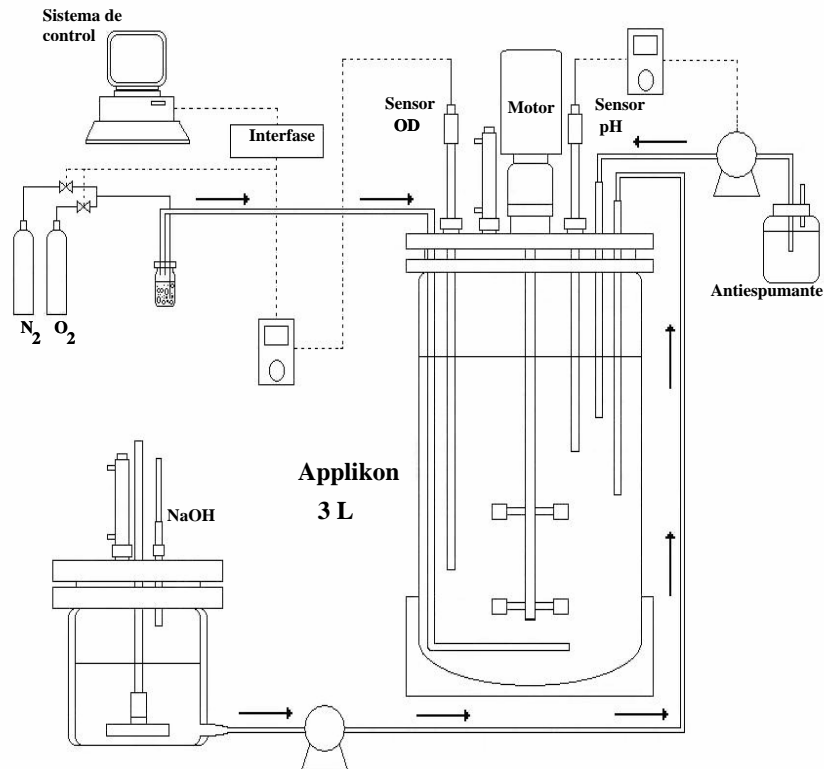


Figura 5.1. Sistema de fermentación, control y adquisición de datos para cultivos.

Dichos cambios se grafican en la llamada curva de reacción del proceso (Fig. 5.2), la cual se encuentra determinada por los siguientes parámetros:

- La pendiente de la tangente en el punto de inflexión, S ;
- El tiempo en que la tangente intercepta al eje del estado estable del que se partió en la variable medida, T_d ;
- La magnitud del cambio escalonado en la variable manipulada, m ;
- La magnitud del cambio obtenido en la variable medida (en el estacionario), b ;
- El tiempo de asentamiento, T_a .

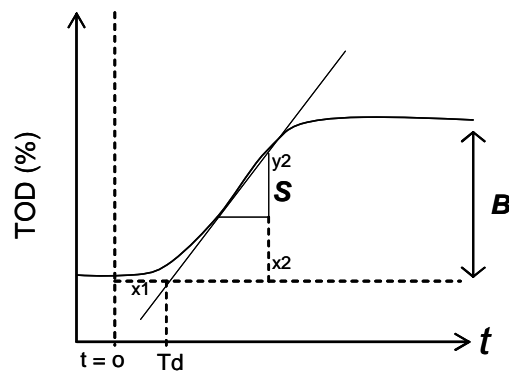


Figura 5.2. Curva de reacción del proceso.

Las constantes se calcularon usando las siguientes expresiones (Ziegles-Nichols, 1942):

$$\text{Constante proporcional: } \frac{1.2}{tdS^*} = Kc$$

$$\text{Constante derivativa: } \frac{td}{2} = Td$$

$$\text{Constante integral: } 2.00td = Ti$$

$$\text{Donde } S^* = \frac{S}{m}$$

Dando como resultado, las siguientes constantes utilizadas para el control de oxígeno en los cultivos:

$$\text{Constante proporcional: } 6$$

$$\text{Constante derivativa: } 7.64$$

$$\text{Constante integral: } 30.7$$

5.4 PARÁMETROS CINÉTICOS

Los datos experimentales de la cinética de crecimiento de *A. vinelandii* fueron descritos por la ecuación logística:

$\frac{\partial X}{\partial t} = \mu X \left(1 - \frac{X}{X_{m\acute{a}x}} \right)$	(Ec. 5.1)
--	-----------

donde μ = velocidad específica de crecimiento (h^{-1}) y $X_{m\acute{a}x}$ = concentración máxima de biomasa (g/L). Integrando la ecuación 5.1, donde $X_0 = X_{(t=0)}$ y reordenando términos:

$X_{(t)} = \left(\frac{X_0 e^{\mu t}}{\left(1 - \frac{X_0}{X_{m\acute{a}x}} \right) (1 - e^{\mu t})} \right)$	(Ec. 5.2)
---	-----------

La velocidad específica de crecimiento (μ) se obtiene de la pendiente generada a través del

gráfico:
$$\ln \left[\frac{\left(\frac{X_t}{X_{m\acute{a}x}} \right)}{\left(1 - \frac{X_t}{X_{m\acute{a}x}} \right)} \right] \text{ vs tiempo}$$

La cinética de formación de producto en función de la biomasa se describió a través del modelo de Luedeking y Piret (Luedeking y Piret, 1959):

$\frac{\partial P}{\partial t} = \alpha \frac{\partial X}{\partial t} + \beta X$	(Ec. 5.3)
--	-----------

Donde $\alpha \frac{\partial X}{\partial t}$ determina la fracción asociada al crecimiento bacteriano y el término βX es la fracción no asociada a la fase de crecimiento. El parámetro β es evaluado en la fase estacionaria de la cinética de crecimiento, donde:

$\frac{dX}{dt} = 0 \text{ y } X = X_{m\acute{a}x} \therefore \beta = \frac{\left(\frac{dP}{dt}\right)}{X_{m\acute{a}x}}$	(Ec. 5.4)
--	-----------

De la combinación de las ecuaciones 5.1 y 5.3, e integrando, se obtiene la ecuación para la formación de producto en el tiempo:

$P(t) = P_0 + \alpha X_0 \left[\frac{e^{\mu t}}{\left(1 - \frac{X_0}{X_{m\acute{a}x}}\right) (1 - e^{\mu t})} \right] + \frac{\beta X_{m\acute{a}x}}{\mu} \left[\left(1 - \frac{X_0}{X_{m\acute{a}x}}\right) (1 - e^{\mu t}) \right]$	(Ec. 5.5)
---	-----------

El valor α está representado por el valor de la pendiente del gráfico:

$$P(t) - P_0 - \beta \left(\frac{X_{m\acute{a}x}}{\mu} \right) \ln \left[\left(1 - \frac{X_0}{X_{m\acute{a}x}}\right) (1 - e^{\mu t}) \right] \text{ vs } X_0 \left[\frac{e^{\mu t}}{\left(1 - \frac{X_0}{X_{m\acute{a}x}}\right) (1 - e^{\mu t})} \right] - 1$$

La cinética de consumo de sacarosa en función de la biomasa se describió a través del modelo modificado de Luedeking y Piret para sustrato (Luedeking y Piret, 1959):

$\frac{\partial S}{\partial t} = -\frac{1}{Y_{X/S}} \frac{\partial X}{\partial t} - \frac{1}{Y_{P/S}} \frac{\partial P}{\partial t} - k_e(X)$	(Ec. 5.6)
---	-----------

Donde $Y_{x/s}$ = rendimiento de biomasa en base sustrato, $Y_{p/s}$ = rendimiento de producto en base a sustrato y K_e = coeficiente de mantenimiento.

De la combinación de las ecuaciones 5.3 y 5.6, se obtiene:

$\frac{\partial S}{\partial t} = -\frac{1}{Y_{x/s}} \frac{\partial X}{\partial t} - \frac{1}{Y_{p/s}} \left(\alpha \frac{\partial X}{\partial t} + \beta X \right) - k_e(X)$	(Ec. 5.7)
---	-----------

Si $A = \left(\frac{1}{Y_{x/s}} + \alpha \frac{1}{Y_{p/s}} \right)$ y $B = \left(\beta \frac{1}{Y_{p/s}} + K_e \right)$, por lo tanto:

$\frac{\partial S}{\partial t} = -A \frac{\partial X}{\partial t} - BX$	(Ec. 5.8)
---	-----------

De la integración de la ecuación 5.7 se obtiene el consumo de sustrato en el tiempo:

$S(t) = S_0 - A(X_t - X_0) - B \left(\frac{X_{m\acute{a}x}}{\mu} \right) \ln \left[\left(1 - \frac{X_0}{X_{m\acute{a}x}} \right) (1 - e^{-\mu t}) \right]$	(Ec. 5.9)
---	-----------

Donde B es evaluado en la fase estacionaria: $\frac{dS}{dt} = -BX_{m\acute{a}x}$. El parámetro A está representado por el valor de la pendiente del gráfico:

$$S_0 - S_t - B \left(\frac{X_{m\acute{a}x}}{\mu} \right) \ln \left[\left(1 - \frac{X_0}{X_{m\acute{a}x}} \right) (1 - e^{-\mu t}) \right] \text{ vs } X_{(t)} - X_0$$

5.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

5.5.1 DETERMINACIÓN DE BIOMASA POR GRAVIMETRÍA

La determinación de biomasa se llevó a cabo a través de un método gravimétrico de peso seco (Peña *et al.* 1997; 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 g durante 20 minutos (centrífuga Eppendorf 5804). Posteriormente, 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 se secó por 24 h a 70°C en estufa (Felisa), finalmente se pesó, obteniendo la cantidad de biomasa (g/L), por diferencia de peso.

5.5.2 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 forma rápida de determinar el crecimiento bacteriano en el medio de cultivo extrapolándolos en la curva estándar, la cual se elaboró utilizando soluciones de biomasa a diferentes concentraciones de las diferentes cepas de *A. vinelandii* utilizadas (Fig. 5.3-5.5) (Priego *et al.* 2005), obteniéndose las siguientes ecuaciones:

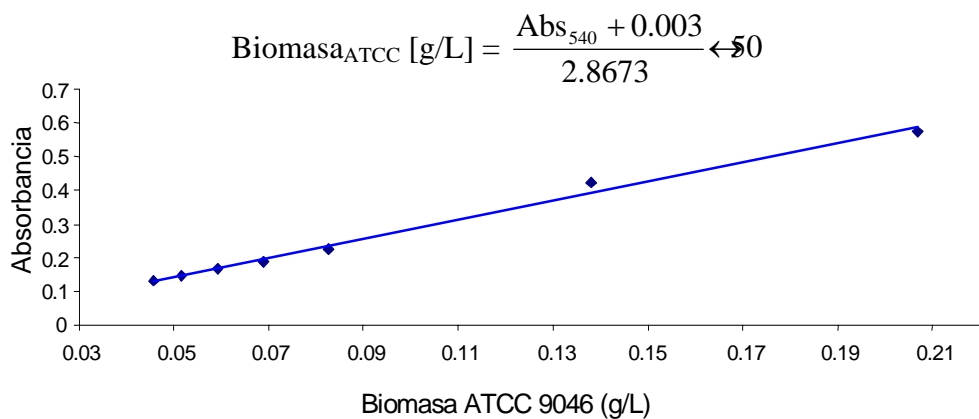


Figura 5.3. Curva estándar para la determinación de biomasa para la cepa ATCC9046.

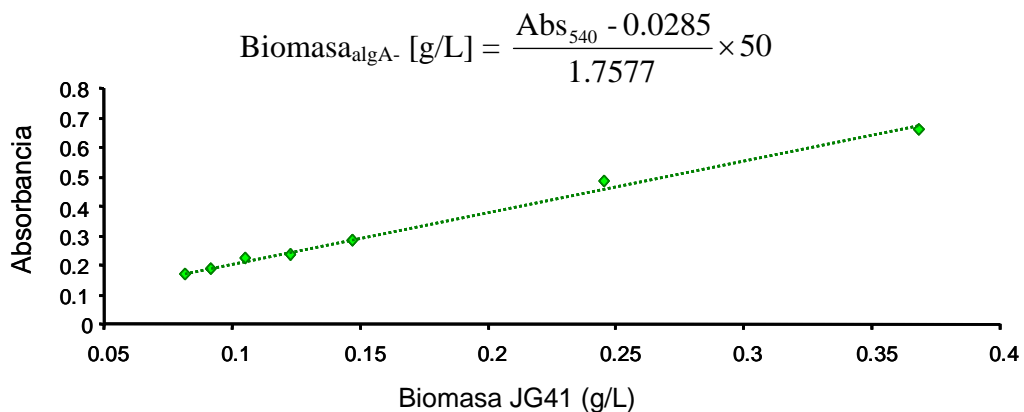


Figura 5.4 Curva estándar para la determinación de biomasa para la cepa JG41.

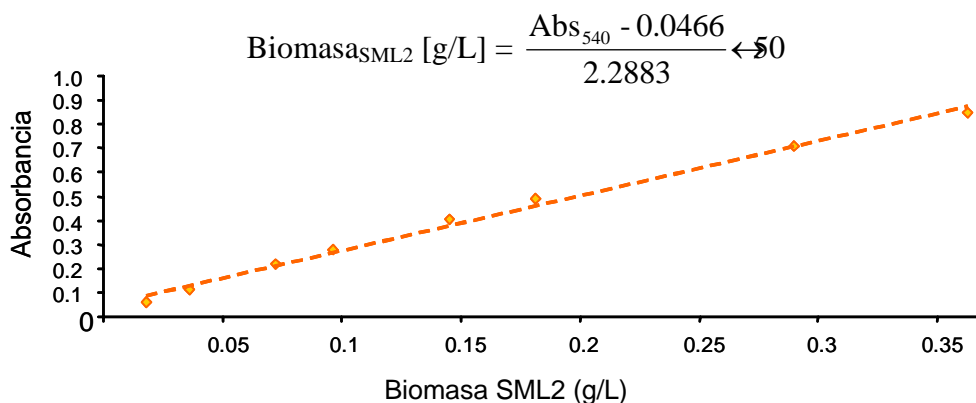


Figura 5.5. Curva estándar para la determinación de biomasa para la cepa SML2.

5.5.3 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL ALGINATO

La técnica se basa en la precipitación del alginato con isopropanol y su cuantificación gravimétrica (Peña *et al*, 1997; Trujillo, 1999). Se mezclaron 10 mL de caldo de cultivo con 1 mL de Na₂EDTA (0.1 M) y 1 mL de NaCl (1.0 M) y posteriormente se centrifugó a 15,500 g (centrífuga Eppendorf 5804) por 20 minutos. Se separó el sobrenadante y se mezcló con 30 mL de isopropanol, dejando reposar 10 minutos, para la precipitación del producto. Posteriormente, se centrifugó nuevamente a 15,500 x g durante 20 minutos. El producto se filtró en membranas *Nucleopore* de 0.22 μm previamente taradas, los cuales se secaron a 70° C por 24 h. Finalmente, se pesó el filtro y se calculó (por diferencia de peso) la concentración del polisacárido en el medio.

5.5.4 DETERMINACIÓN DE SACAROSA POR EL MÉTODO DE β-FRUCTOSIDASA-DNS

El fundamento de este método se basa en la hidrólisis enzimática del disacárido para producir una molécula de glucosa y una de fructosa, utilizando una invertasa y la posterior medición colorimétrica de los azúcares reductores libres por medio de la reducción del ácido dinitrosalicílico (DNS). Se forma un compuesto amarillo nitro-aminado, cuya densidad óptica es proporcional a la concentración de grupos reductores, a una longitud de onda de 540 nm (Miller 1959).

Las soluciones se prepararon de la manera siguiente: para la solución de DNS (3,5 ácido dinitrosalicílico) se pesaron 16 g de hidróxido de sodio, 300 g de tartrato de sodio y potasio

y lentamente se vertieron 10 g de DNS. Se mezcló en ese orden en 1 L de agua destilada. La solución enzimática se preparó con 20 mg de enzima β -Fructosidasa (Gist-Brocades, actividad de 243 U/mg 40°C) y se disolvió en 4 ml de amortiguador de citratos (0.32 M y pH 4.6).

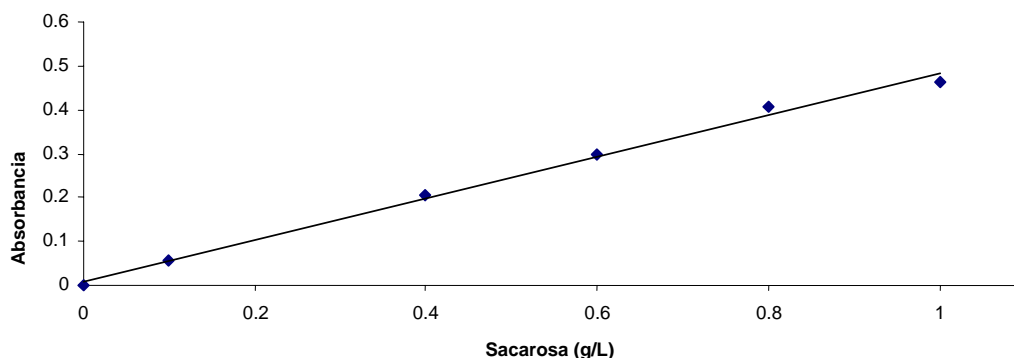


Figura 5.6. Curva estándar para la determinación de sacarosa.

Para las mediciones de sacarosa del caldo de fermentación, las muestras se diluyeron 1/25 con agua destilada, de éstas se tomaron 900 μ l y se mezclaron con 100 μ l de la solución enzimática. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos y posteriormente se agregó 1.0 ml de DNS a cada muestra. Los tubos se calentaron a ebullición durante 5 minutos, enfriándose en un baño de hielo inmediatamente después. A cada tubo se le agregaron 10 ml de agua destilada y se leyó la absorbancia a 540 (espectrofotómetro Beckman DU 650) contra un blanco de reactivos. Para la cuantificación de la sacarosa, los valores de absorbancia se extrapolaron en la curva estándar, previamente realizada (Fig. 5.6), utilizando soluciones de sacarosa en concentraciones de 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 g/l (Trujillo 2003), obteniéndose la siguiente ecuación:

$$\text{Sacarosa [g/ml]} = \frac{\text{Abs}_{540} - 0.0096}{0.4744} \leftarrow 25$$

5.5.5 DISTRIBUCIÓN DE PESOS MOLECULARES

La distribución de pesos moleculares se determinó por cromatografía de filtración en gel (CFG) usando un precolumna *Ultrahidrogel* de 6 mm (diámetro interno) por 40 mm, seguida de dos columnas *Ultrahidrogel* (lineal Waters y UG 500 Waters) de 7.8 x 300 mm.

Las columnas fueron acopladas en serie a un equipo de HPLC (Waters, 625) con un detector de índice de refracción (Waters, 2414). Como fase móvil se utilizó NaNO_3 0.1 M a 35 °C a un flujo de 0.9 mL/minuto. El tiempo de corrida de la muestra fue de 30 min. La señal del detector fue procesada con un programa para PC compatible (Empower, Waters). La calibración de las columnas se llevó a cabo con un método estándar de calibración (Peña *et al.* 1997), utilizando pululanos de *Aureobasidium pullulans* marca Shodex, como estándares de peso molecular con un intervalo de 5,900 a 1,600,000 daltones Para el análisis se inyectaron 100 μL de muestra (0.003 g de alginato bacteriano disuelto en 1 mL de solución de NaNO_3 0.1 M y filtrada en membrana *Nucleopore* de 0.22 μm).

5.5.6 DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS ÚRÓNICOS POR EL MÉTODO DE META-HIDROXIDIFENIL (Blumenkrantz and Asbde-Hanson, 1973).

Se prepararon soluciones de metahidroxifenil al 0.15 % en NaOH (0.5 %) y solución 12.5 mM de tetraborato de sodio en ácido sulfúrico concentrado.

Para la realización de la curva estándar (Fig. 5.7), de una solución final de alginato algal 10 mg/ml, se prepararon cinco diluciones (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0), obteniéndose la siguiente curva:

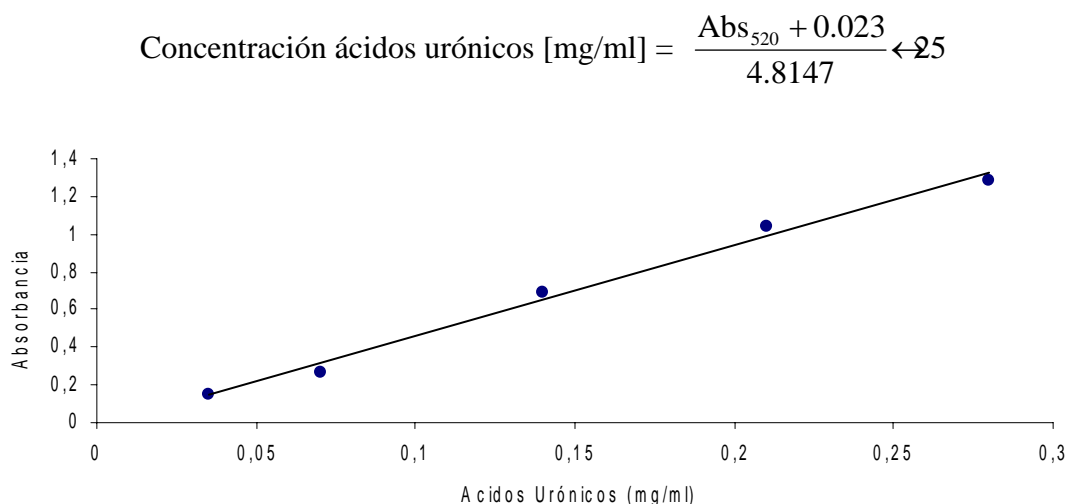


Figura 5.7. Curva estándar para la determinación de ácidos urónicos.

Para las mediciones realizadas al caldo de fermentación cada muestra se diluyó 1/25 con agua destilada. De éstas, se tomaron 200 μl y se mezclaron con 1.2 ml de la solución de

tetraborato en H₂SO₄. Las muestras se dejaron en baño de hielo por 10 min. Después, se colocaron en baño maría de agua hirviendo por 5 min y se enfrió, agregando después 20 µl de metahidroxidifenil agitando en un vórtex. Posteriormente, las muestras se dejaron en baño de hielo por 30 min y se leyó la absorbancia a 520 nm.

5.5.7 DETERMINACIÓN DE LA PROTEÍNA EXTRACELULAR EN EL SOBRENADANTE

La concentración de proteína extracelular en el sobrenadante, se determinó mediante el *Kit* de Bio-Rad® (California, USA), el cual se basa en el método de Bradford. Esta técnica implica la adición de un colorante ácido, azul de Coomassie, a la solución de la proteína, que une principalmente aminoácidos básicos y aromáticos de una proteína, con la subsiguiente medición de la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro, (espectrofotómetro Beckman DU 650).

Fue necesario realizar una curva estándar para poder efectuar la medición (Fig. 5.8). Para esto, se reconstituyó el liofilizado de albúmina bovina (*Kit* Bio-Rad), con agua desionizada y se obtuvo una solución final de 10 µg/ml. De ahí se preparan cinco diluciones (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 µg/ml) y se obtuvo la siguiente curva:

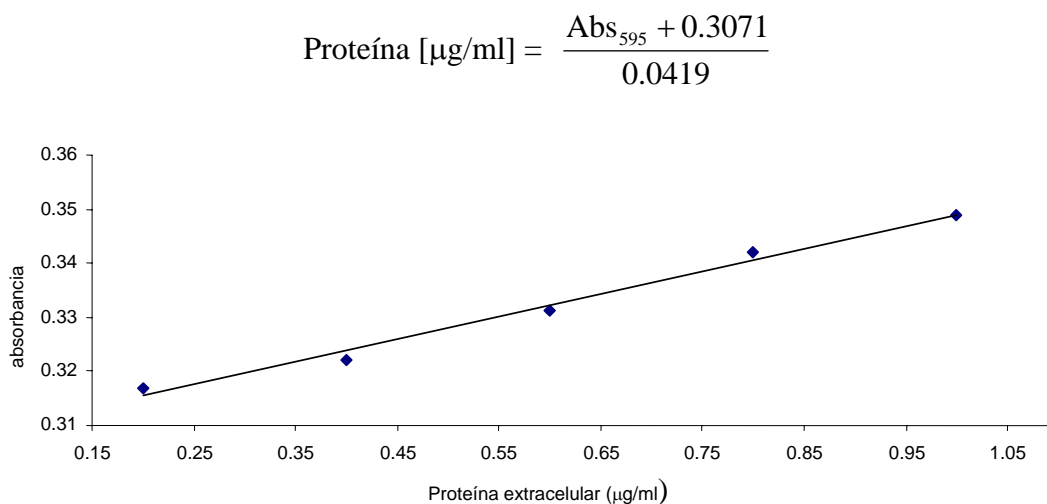


Figura 5.8. Curva estándar para la determinación de proteína extracelular.

Para la medición de la proteína extracelular al caldo de cultivo se tomó una muestra de 800 μ l de caldo de cultivo y se le adicionan 200 μ l de solución diluida, preparada diluyendo una parte del concentrado (Bio-Rad) con cuatro partes de agua destilada, se incuban por 30 minutos y se lee la absorbancia a 595 nm.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La primera sección se conforma de los experimentos realizados para determinar el papel de las alginasas presentes en el inóculo. Estos cultivos se realizaron en matraces agitados, bajo condiciones no controladas de oxígeno disuelto y pH (ver capítulo V). La segunda sección, comprende los experimentos realizados para determinar el papel del alginato y/o oligosacáridos de alginato presentes en el inóculo. Los cultivos se realizaron en fermentador bajo estrictas condiciones controladas de oxígeno disuelto y pH (ver capítulo V). Todos los cultivos se realizaron siguiendo la estrategia experimental descrita en el capítulo IV.

6.1 PAPEL DE LAS ALGINASAS PRESENTES EN EL INÓCULO, SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ALGINATO Y SU PESO MOLECULAR.

Dentro de los componentes presentes en el inóculo en cultivos de *A. vinelandii*, se ha logrado observar un conjunto de proteínas en el rango de 20-200 kDa, de las cuales la más estudiada ha sido la alginasa (Wong *et al.* 2000). En estudios previos (Trujillo-Roldán *et al.* 2003a) se ha reportado que en el sobrenadante proveniente del inóculo (en matraces a 24 h de cultivo), la cepa parental presenta una actividad alginasa de 0.15 U/mg_{proteína}. Por su parte, Trujillo-Roldán *et al.* (2004) trabajaron con una mutante que carece de alginasa (SML2) donde esta enzima (codificada por el gen *algL*), es la encargada de la depolimerización del alginato en cultivos en reactor bajo condiciones controladas.

Por lo tanto, en la primera etapa del trabajo se decidió evaluar el efecto de la alginasa presente en el inóculo sobre la concentración de alginato y su peso molecular, a través del uso del sobrenadante de la cepa mutante SML2 (sobrenadante libre de alginasas).

En la figura 6.1 se presenta la cinética de crecimiento de los cultivos desarrollados usando el sobrenadante de la cepa mutante no productora de alginasas (●LL) y su comparación con el crecimiento observado en los cultivos con inoculación con células sin lavar (■SL) y aquellos en donde se lavaron las células (□Lv). Es claro que la ausencia de sobrenadante causa una disminución en la velocidad de crecimiento (μ), ya que en los cultivos con células lavadas (Lv)

el valor de μ fue de 0.11 h^{-1} , respecto a un valor de 0.17 h^{-1} que se alcanzó en los cultivos inoculados con células sin lavar (*SL*) (tabla 6.1).

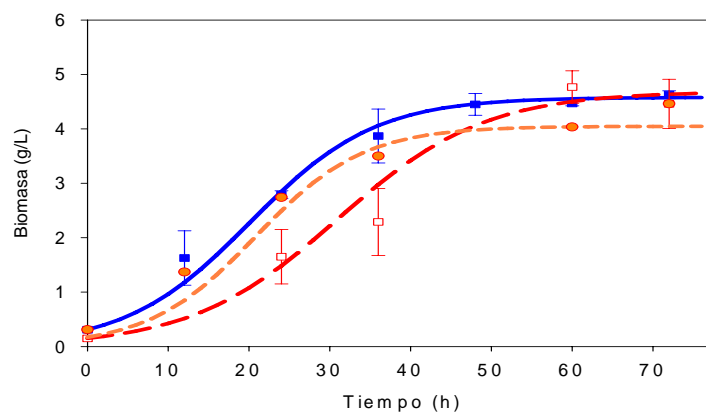


Figura 6.1. Cinéticas de crecimiento en matraces agitados. ■—*SL*: células sin lavar. □ *Lv*: células lavadas. ● *LL*: inóculo libre de liasas. Las líneas representan la tendencia.

En el caso de los cultivos inoculados con el sobrenadante libre de liasas (pero en donde están presentes los otros componentes del sobrenadante), el valor de μ fue de 0.16 h^{-1} similar al que se obtiene a cultivos inoculados con células sin lavar (0.17 h^{-1}), *SL*. Por lo que la actividad alginasa (presente en el inóculo) no parece ser la responsable de las diferencias observadas en términos del crecimiento bacterial entre los cultivos. Dichas diferencias observadas en los cultivos, pudieran deberse a otros componentes presentes en inóculo de *A. vinelandii*, como son oligosacáridos de alginato u otros componentes.

Esto concuerda con lo reportado previamente por Trujillo (2004), quien propone que la alginasa presente en el inóculo no es la responsable de los cambios observados en los cultivos. Sin embargo, cabe aclarar, que en el trabajo mencionado (Trujillo, 2004) se controló el oxígeno disuelto y el pH durante toda la fermentación, mientras que en el presente estudio no se controlaron.

Se ha visto que los oligosacáridos de alginato promueven un mayor crecimiento en *Bifidobacteria*, cuando se añaden a los cultivos (Akiyama *et al.* 1992; Brownlee *et al.* 2005). De manera similar y de acuerdo a los resultados presentados en la figura 6.1, los oligosacáridos presentes en el inóculo pudieran estimular un mayor crecimiento bacterial, probablemente generado por la acción basal de la alginasa AlgL, en un mecanismo no

dilucidado hasta ahora. Cabe recordar que en todos los cultivos y especialmente donde se encuentran presentes los oligosacáridos de alginato (■SL y ●LL), se utilizaron células provenientes de la cepa parental.

Tabla. 6.1. Parámetros cinéticos más importantes de los cultivos realizados bajo dos formas de inoculación, y su comparación con los cultivos inoculados sin alginasas, y cultivos inoculados con células resuspendidas.

Parámetros cinéticos	Forma de Inoculación			
	Sin lavar (SL)	Lavadas (Lv)	Sin alginasas (LA)	Células Resuspendidas (CR)
Velocidad de crecimiento, μ (h^{-1})	0.17 +/- 0.03	0.11 +/- 0.06	0.16 +/- 0.01	0.16 +/- 0.02
Rendimiento, $Y_{p/s}$ ($\text{g}_{\text{alginato}}/\text{g}_{\text{sac}}$)	0.16 +/- 0.05	0.16 +/- 0.04	0.16 +/- 0.02	ND
Rendimiento, $Y_{x/s}$ ($\text{g}_{\text{cél}}/\text{g}_{\text{sac}}$)	0.22 +/- 0.00	0.20 +/- 0.04	0.22 +/- 0.02	0.21 +/- 0.06
Velocidad específica de consumo de sustrato, ($\text{g}_{\text{sac}}/\text{g}_{\text{cél}}\text{h}$)	0.08 +/- 0.01	0.16 +/- 0.05	0.17 +/- 0.02	0.09 +/- 0.02

ND, no determinados.

La figura 6.2.a presenta los datos de producción de alginato al final de los cultivos (72 h) con las tres diferentes formas de inoculación evaluadas. Se observa que no existen diferencias significativas en la concentración final del polímero, obteniéndose un promedio 2.7 g/L +/- 0.4. Así mismo, en la figura 6.2.b se presentan los valores máximos de peso molecular del alginato aislado de las tres condiciones de inoculación probadas. Para establecer diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos, se utilizó una prueba de *t* al 95% de confianza. Al igual que en la concentración de alginato, no existen diferencias significativas ($P = 0.04$) en los valores de peso molecular determinados en los diferentes productos. Se alcanza un peso molecular promedio de (889 kDa +/-174).

A la luz de los resultados previamente presentados se observa que la forma de inoculación bajo condiciones no controladas de oxígeno y pH, no parece influir en la producción y peso molecular del alginato sintetizado por *A. vinelandii*. Lo anterior contrasta con lo previamente reportado por Trujillo-Roldán *et al.* (2003a), quienes encontraron diferencias claras en

términos de la concentración de alginato y el peso molecular del polímero. Lo anterior se puede deber a las diferencias en las condiciones de cultivo empleadas en ambos trabajos. Ya que como se mencionó anteriormente, en sus cultivos, Trujillo-Roldán *et al.* (2003a) controlaron el oxígeno disuelto y el pH durante todo el proceso y en nuestro estudio ambos parámetros no fueron constantes.

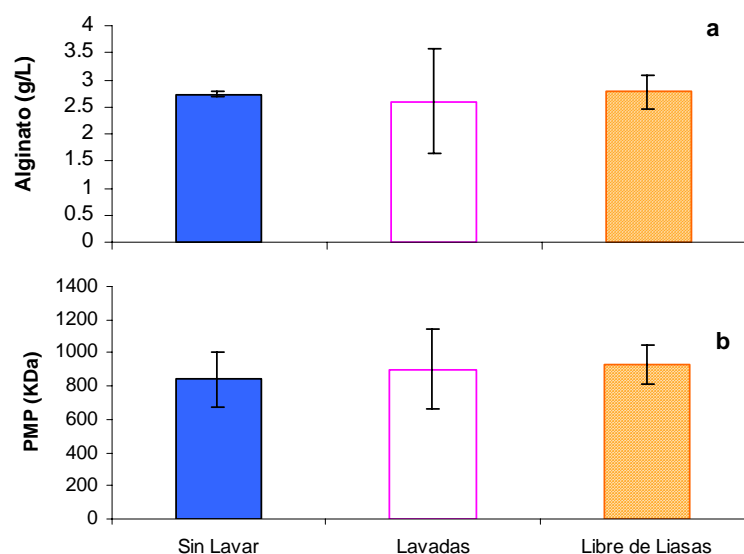


Figura 6.2. Producción de alginato (a) y pesos moleculares promedio (b) de cultivos en matraces.

En la figura 6.3 se presentan las cinéticas de consumo de sacarosa. Se observa que en los cultivos donde se realiza el proceso de separación celular, ya sea en los cultivos inoculados sólo con células ($\square Lv$, línea discontinua) o cultivos con células y suplemento de cepa mutante liasa menos ($\bullet LL$), se encontró que la fuente de carbono es consumida más rápidamente que en cultivos donde no se realizó la separación celular ($\blacksquare SL$, línea continua). Estas diferencias se ven reflejadas en las velocidades específicas de consumo de sustrato (tabla 6.1). Así, en los cultivos sometidos al proceso de separación (Lv y LL) fue de $0.17 \pm 0.02 \text{ g}_{\text{sac}}/\text{g}_{\text{cel}}\text{h}$; mientras que, en los cultivos en donde no se lavan las células (SL), la velocidad de consumo de sacarosa fue claramente inferior ($0.08 \pm 0.03 \text{ g}_{\text{sac}}/\text{g}_{\text{cel}}\text{h}$). No obstante, estas diferencias en el consumo de sustrato no se ven reflejadas en un incremento en biomasa o producción de alginato; estimándose rendimientos de biomasa con base en sustrato ($Y_{x/s}$) y de alginato con base a sustrato ($Y_{p/s}$) similares para las tres condiciones probadas (Tabla 6.1).

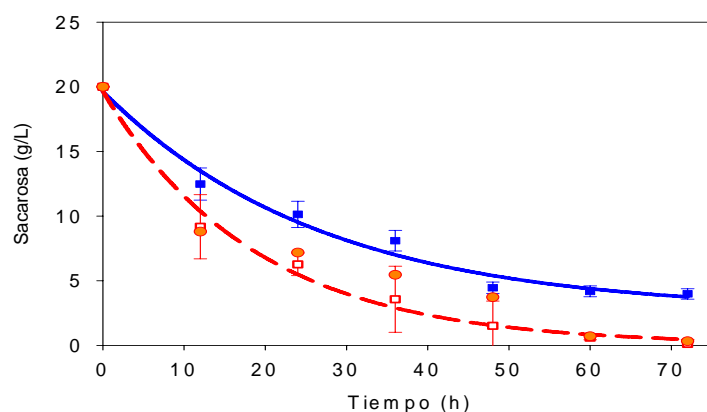


Figura 6.3. Cinéticas de consumo de sacarosa en matraces. ■— *SL*: células sin lavar. □ — — *Lv*: células lavadas. ● — — *LL*: inóculo libre de liasas. Las líneas representan la tendencia.

Una constante de los cultivos donde las velocidades de consumo fueron mayores, fue que en ambos casos, las células se separaron por centrifugación. Por tal razón, con el propósito de identificar si el proceso de separación pudiera estar influyendo en las diferencias en las velocidades de consumo de sacarosa y de crecimiento bacteriano, se realizó un experimento adicional. En este experimento, las células lavadas de la cepa parental (ATCC9046) sometidas a centrifugación, fueron resuspendidas en el mismo medio en el cual se encontraban, para posteriormente inocular un matraz por duplicado. Se utilizaron como controles, cultivos inoculados convencionalmente (*SL*) y cultivos con células lavadas (*Lv*). Los resultados de éste experimento se muestran en la figura 6.4.

Se puede observar que el procedimiento mecánico de separación de las células por centrifugación (▲*CR*), no influye ni sobre el crecimiento bacteriano ni sobre el consumo de azúcar. En la figura 6.4.a se observa que la producción máxima de biomasa y la velocidad de crecimiento, son iguales a los cultivos *SL*, en ambas condiciones (4.3 g/L y $\mu = 0.16$ respectivamente) (Tabla 6.1).

En la figura 6.4.b se observa que los cultivos inoculados con células resuspendidas (▲*CR*) presentan tendencias de consumo de sacarosa similares a los cultivos inoculados convencionalmente (■*SL*) (tabla 6.1). Con base en estos resultados, se descarta la posibilidad

de que la mayor velocidad de consumo presente en las células lavadas se deba a un efecto mecánico provocado durante la separación del medio de cultivo agotado.

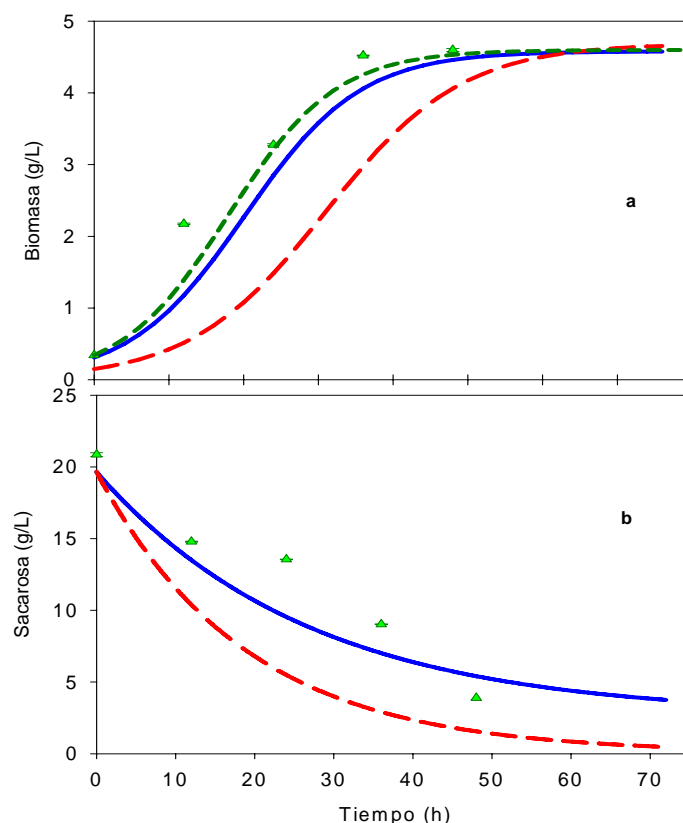


Figura 6.4. Cinéticas de crecimiento (a) y consumo de sacarosa (b) en matraces. —*SL*: células sin lavar. - -*Lv*: células lavadas. ▲*CR*: inóculo sometido a separación y resuspendido en su sobrenadante.

Por lo tanto, el fenómeno observado del mayor consumo de sacarosa pudiera deberse a la ausencia de las alginasas en el inóculo. Se ha reportado previamente que las alginasas (Trujillo-Roldán *et al.* 2004) son la principal causa de la degradación del alginato, principalmente al final de los cultivos, ya que son expulsadas del espacio periplásmico de la células al espacio extracelular, debido a una lisis celular (en cultivos realizados a 3 % TOD, 7.2 pH y 700 rpm). Esta degradación del polímero por la enzima a lo largo del cultivo, genera oligosacáridos de alginato, que pudieran estar involucrados en la regulación del consumo de sustrato. Como previamente se señaló existen evidencias sobre el papel que tienen oligosacáridos de alginato en el crecimiento de *Bifidobacteria* (Brownlee *et al.* 2005;

Akiyama *et al.* 1992). Sin embargo, en dicho estudio no se presentan datos que hablen de los efectos sobre la velocidad de crecimiento.

6.2 PAPEL DEL ALGINATO Y OTROS COMPONENTES PROVENIENTES DEL INÓCULO EN CULTIVOS DE *A. vinelandii* BAJO CONDICIONES CONTROLADAS DE CULTIVO

Entre los componentes del inóculo de *A. vinelandii*, solamente se encuentran descritos aquellos como el alginato y las enzimas que modifican a dicho producto, como el caso de las alginasas (Trujillo-Roldán *et al.* 2003a,b; Trujillo-Roldán *et al.* 2004; Galindo *et al.* 2007). El alginato proveniente del inóculo llega a representar hasta 1 g/L, después de 24 h del desarrollo del inóculo. No obstante, existen alginatos (presentes en el inóculo) con diferentes pesos moleculares: desde polímeros de muy bajo PMP (8 kDa) hasta fracciones de alto peso molecular (186 kDa) (Galindo *et al.* 2007). Así mismo, existen otros componentes del inóculo que comprenden proteínas y azúcares, así como otras tantas moléculas desconocidas, que pueden estar jugando un papel regulador en la síntesis de alginato. Todo este conjunto de compuestos son suministrados junto con células bacterianas, al medio fresco donde se realizará la fermentación.

Por tal razón, la estrategia experimental se basó en el uso del sobrenadante de una cepa de *A. vinelandii* no productora de alginato (JG41) (Segura *et al.* 2003), en cultivos bajo condiciones controladas de oxígeno disuelto y pH (ver capítulo V). Es importante señalar que en trabajos previos, se ha demostrado que la síntesis del alginato por *A. vinelandii* y la regulación de su peso molecular, se encuentran influenciados por la tensión de oxígeno disuelto (TOD) y la velocidad de agitación (Peña *et al.* 2000; Sabra *et al.* 2001; Trujillo-Roldán *et al.* 2001; Trujillo-Roldán *et al.* 2004). Por tal razón, en esta etapa del proyecto los cultivos se llevaron a cabo a 3 % de TOD, 700 rpm y pH constante de 7.2, ya que previamente se han descrito como condiciones óptimas para la producción de alginatos. La figura 6.5 muestra los perfiles típicos de la evolución de la tensión de oxígeno disuelto y pH durante los cultivos de *A. vinelandii*. Para establecer diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos, se utilizó una prueba de *t* al 95 % de confianza.

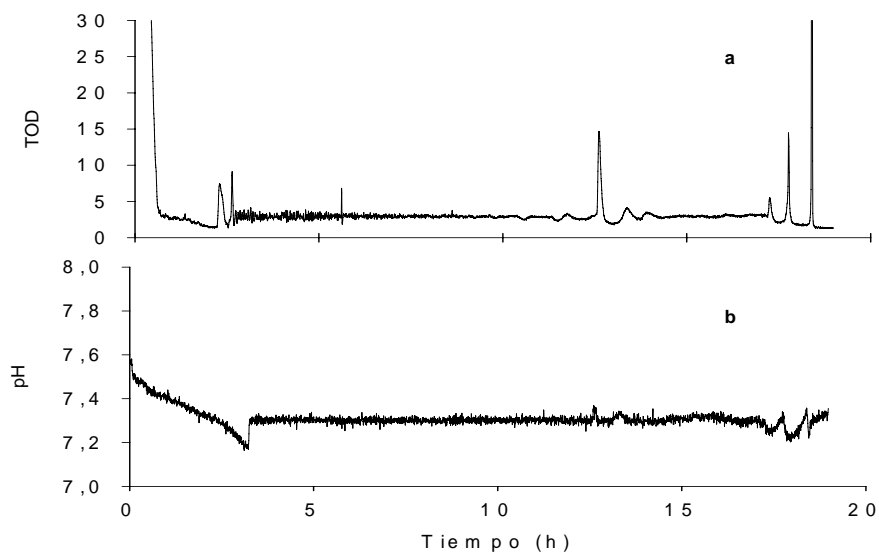


Figura 6.5. Perfil de la tensión de oxígeno disuelto a 3% (a) y pH 7.2 (b), durante los cultivos realizados.

6.2.1 INFLUENCIA DEL ALGINATO PROVENIENTE DEL INÓCULO SOBRE LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO EN CULTIVOS DE *A. vinelandii*

Dentro de los componentes del inóculo de *A. vinelandii* podemos encontrar alginato y sus oligosacáridos. Dichos oligosacáridos de alginato han sido reportados como activadores de moléculas que pueden regular funciones fisiológicas, en hongos y bacterias, así como ser los responsables del mecanismo de defensa en algunas plantas y células animales (Bland *et al.* 2004). Por tal razón, en la siguiente etapa del trabajo se decidió evaluar el papel del alginato y sus oligosacáridos presentes en el inóculo, sobre la velocidad de crecimiento de *A. vinelandii*.

En la figura 6.6 se presentan las cinéticas de crecimiento en los cultivos control, desarrollados utilizando inoculación convencional con células sin lavar (■*SL*) y su comparación con la cinética de crecimiento en los cultivos con células lavadas (□*Lv*), libres del sobrenadante, al igual que en los cultivos en matraces (condiciones no controladas). La ausencia del sobrenadante causa una disminución en la velocidad específica de crecimiento (μ), ya que en los cultivos inoculados con células sin lavar, el valor de μ fue mayor (0.28 h^{-1}) con respecto al logrado en cultivos con células lavadas (0.25 h^{-1}) (Fig. 6.6 y tabla 6.2). A su vez, la concentración máxima de biomasa en los cultivos inoculados convencionalmente con células

sin lavar es mayor (2.5 g/L) respecto a los cultivos realizados con células lavadas (1.8 g/L) (tabla 6.2).

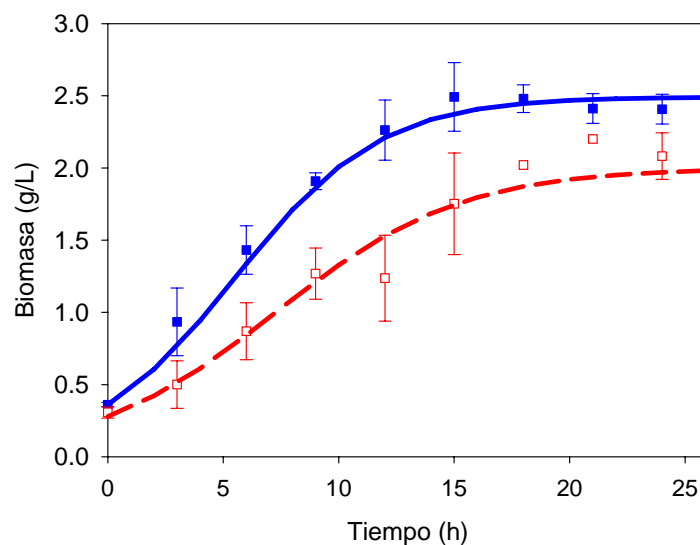


Figura 6.6. Cinética de crecimiento de cultivos de *A. vinelandii* en fermentador, desarrollados bajo dos formas de inoculación, ■— SL: células sin lavar. □— LV: células lavadas. Las líneas representan la tendencia.

Tabla. 6.2. Parámetros cinéticos más importantes de los cultivos realizados bajo dos formas de inoculación, y su comparación con los reportados por Trujillo 2003 y Trujillo-Roldán *et al.* 2003a.

Cepa	Forma de inoculación	Velocidad específica de crecimiento, μ (h^{-1})	Biomasa máxima ($\text{g}_{\text{cél}}/\text{L}$)
Parental (ATCC9046)	Sin lavar [§]	0.28 +/- 0.01	2.5 +/- 0.1
	Lavadas [§]	0.25 +/- 0.01	1.8 +/- 0.2
	Inoculación convencional*	0.21	4.0
	Células Lavadas*	0.20	3.8
Fenotipo alginasa— (SML2)	Inoculación convencional [†]	0.16	5.0
	Células Lavadas [†]	0.13	3.9

[§] Este trabajo; [†]Trujillo 2003; *Trujillo-Roldán *et al.* 2003a.

Trujillo-Roldán *et al.* (2003a) reportaron que en cultivos realizados bajo las dos formas de inoculación, utilizando la cepa parental, no se observaron diferencias significativas ni en la velocidad de crecimiento (0.21 h^{-1}) ni en la concentración máxima de biomasa (4 g/L) (tabla 6.2). Sin embargo, en los cultivos realizados con la cepa mutante no productora de alginasas

(SML2), Trujillo (2003) sí observó diferencias en la velocidad de crecimiento entre ambas formas de inoculación (0.16 h^{-1} para células sin lavar y 0.13 h^{-1} para células lavadas). Aunque el autor no explica a qué se puede deber dicho fenómeno. Como más adelante se discute, estas diferencias con respecto al trabajo anteriormente descrito, están relacionadas con las características de fermentación y de oxígeno disuelto en los biorreactores empleados en ambos estudios.

En la figura 6.7 se muestra la cinética de crecimiento de los cultivos control (—*SL* y - -*Lv*) y de cultivos inoculados con el sobrenadante de la cepa no productora de alginato (▲*LA*). En la condición de cultivos inoculados con el sobrenadante libre de alginato (en el cual están presentes todos los componentes del inóculo menos el alginato), el valor de μ fue de 0.24 h^{-1} similar al valor obtenido para cultivos inoculados con células lavadas (0.25 h^{-1}).

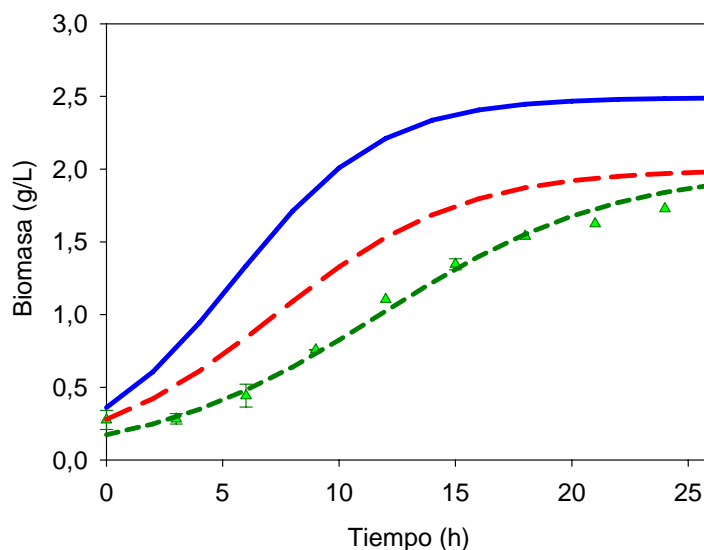


Figura 6.7. Cinéticas de crecimiento de cultivos de *A. vinelandii* desarrollados bajo dos formas de inoculación, y su comparación con los cultivos inoculados sin alginato. Controles: *SL*: línea continua — células sin lavar. *Lv*: - - células lavadas. ▲ - - *LA*: inóculo libre de alginato.

Con base en estas evidencias, el alginato presente (incluyendo oligómeros del mismo) en el inóculo, parece ser el responsable de las diferencias en el crecimiento de *A. vinelandii*, observadas en los cultivos control: células sin lavar (con alginato) y células lavadas (sin alginato) (tabla 6.3).

Tabla. 6.3. Parámetros cinéticos más importantes de los cultivos realizados bajos dos formas de inoculación y su comparación con los cultivos inoculados sin alginato (suplemento mutante).

Parámetro cinético	Forma de Inoculación		
	Sin Lavar (SL)	Lavadas (Lv)	Sin alginato (LA)
Velocidad específica de crecimiento, μ (h^{-1})	0.28 +/- 0.01	0.25 +/- 0.01	0.24 +/- 0.0
Biomasa máxima, ($\text{g}_{\text{cél}}/\text{L}$)	2.5 +/- 0.1	1.8 +/- 0.2	1.7 +/- 0.0

En otros modelos biológicos, se ha observado que los oligosacáridos de alginato estimulan un mayor crecimiento en *Bifidobacterias* cuando son añadidos a los cultivos (Akiyama *et al.* 1992; Brownlee *et al.* 2005). Estos oligosacáridos pudieran ser los activadores de un posible mecanismo que influye positivamente en el crecimiento de *A. vinelandii*. Anteriormente, se mencionó que en el inóculo de los cultivos de *A. vinelandii* se encuentran diversas familias de alginato con distintos pesos moleculares (Galindo *et al.* 2007). Por lo tanto, se procedió a tamizar el inóculo para determinar si el alginato o los oligómeros de éste fuesen los responsables de los cambios observados en μ .

El tamizado se realizó a través de ultrafiltración del sobrenadante proveniente del inóculo (ver sección 5.3.2.1), con dos cortes moleculares ≤ 100 kDa y ≤ 5 kDa. Se infiere que en la fracción de ≤ 5 kDa se tienen oligómeros de alginato con un grado de polimerización (cantidad de monómeros que constituye al polímero) cercano a 25, mientras que en la fracción de ≤ 100 kDa se encuentran oligosacáridos y polímeros de peso molecular intermedio.

Se puede observar en la figura 6.8 que añadir el sobrenadante con la fracción de ≤ 5 kDa proveniente del sobrenadante, no permite alcanzar los mismos valores de la velocidad de crecimiento ($\mu = 0.24 \text{ h}^{-1}$) que los observados con la inoculación convencional (0.28 h^{-1}), en donde esta presente todo el alginato y demás componentes. De hecho, los cultivos inoculados con la fracción ≤ 5 kDa exhiben una velocidad de crecimiento similar a la que se obtiene con los cultivos desarrollados partiendo de una inoculación con células lavadas (0.25 h^{-1}) (tabla 6.4).

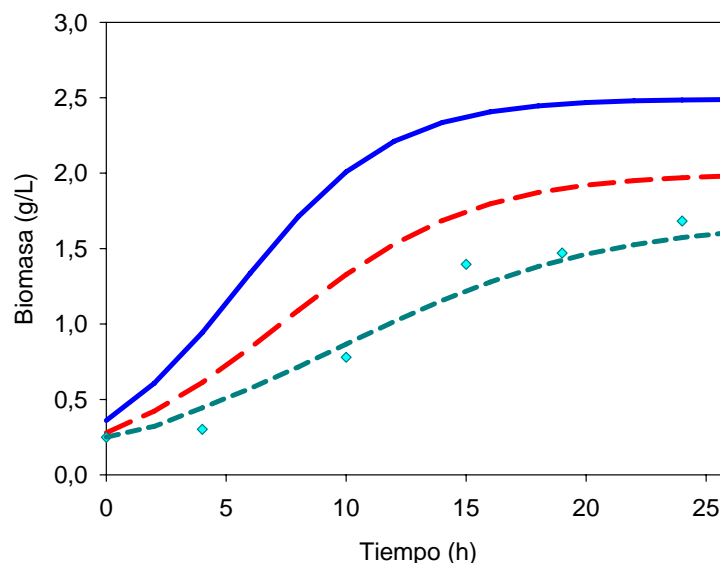


Figura 6.8. Cinéticas de crecimiento en cultivos de *A. vinelandii* en fermentador, desarrollados bajo dos formas de inoculación, y su comparación con los cultivos inoculados con la fracción <5 kDa del sobrenadante. Controles: SL: línea continua — células sin lavar; Lv: — — células lavadas. ◆ — — CF5: fracción menor o igual a 5 kDa, proveniente de la cepa parental.

Tabla. 6.4. Parámetros cinéticos más importantes de los cultivos realizados bajo dos formas de inoculación y su comparación con los cultivos inoculados con las fracciones del sobrenadante de ≤ 100 y ≤ 5 kDa.

Parámetro cinético	Forma de Inoculación			
	Sin lavar (SL)	Lavadas (Lv)	≤ 5 kDa (CF5)	≤ 100 kDa (CF100)
Velocidad de crecimiento, μ (h^{-1})	0.28 +/- 0.01	0.25 +/- 0.01	0.24 +/- 0.00	0.23 +/- 0.03
Biomasa máxima, ($\text{g}_{\text{cél}}/\text{L}$)	2.5 +/- 0.1	1.8 +/- 0.2	1.5 +/- 0.0	2.1 +/- 0.5

La figura 6.9 presenta las cinéticas de crecimiento de cultivos inoculados con el suplemento de ≤ 100 kDa proveniente del inóculo y su comparación con los cultivos control. La velocidad específica de crecimiento en los cultivos inoculados con fracciones ≤ 100 kDa del sobrenadante (tabla 6.4), es similar (0.23 h^{-1}) a la observada en los cultivos con células lavadas (0.25 h^{-1}) e inferior que en los cultivos con células sin lavar (0.28 h^{-1}).

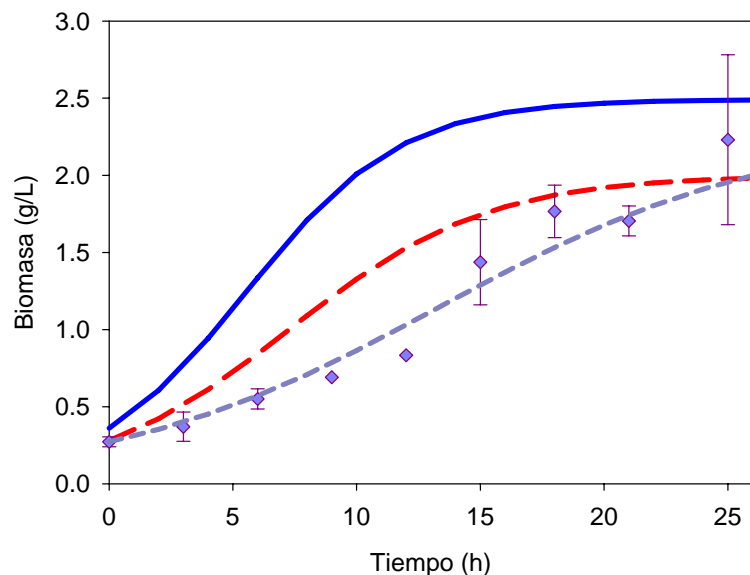


Figura 6.9. Cinéticas de crecimiento en cultivos de *A. vinelandii* en fermentador, desarrollados bajo dos formas de inoculación, y su comparación con los cultivos inoculados con la fracción <100 kDa del sobrenadante. Controles: —SL: células sin lavar; - -Lv: células lavadas. ◆ - -CF100: fracción menor o igual a 100 kDa, proveniente de la cepa parental.

Con base en el comportamiento observado al utilizar como inóculo las fracciones de dos cortes moleculares provenientes del sobrenadante, se puede inferir que los componentes de medio y bajo peso molecular ≤ 100 kDa (oligosacáridos de alginato y demás componentes) no son los responsables de activar el crecimiento en los cultivos en donde se aplica la inoculación con todo el sobrenadante, células sin lavar (SL). Por lo tanto, todo apunta a que la fracción del inóculo mayor a 100 kDa, en especial el alginato, pudiera ser la involucrada en promover el crecimiento de *A. vinelandii* en cultivos líquidos. Aunque dicha fracción no fue probada.

Una posible explicación para el comportamiento observado en el crecimiento de *A. vinelandii*, donde la presencia de la fracción >100 kDa favoreciera el crecimiento del cultivo, podría atribuirse a dos causas. Por una parte, el alginato contenido en la fracción mayor a 100 kDa, pudiera estar actuando como una posible barrera difusional de moléculas. En este contexto Sabra *et al.* (2000) propone que en *Azotobacter vinelandii* la cápsula de alginato alrededor de

la célula no sólo se comporta como una barrera difusional contra el oxígeno, sino también en contra otros constituyentes del medio.

Otra posibilidad es que la fracción >100 kDa del sobrenadante presente un “efecto activador” y ser posiblemente dependiente de la concentración de algún metabolito(s), contenido en dicha fracción. Se ha reportado que existen metabolitos capaces de estimular el crecimiento o acelerar la muerte de las células bacterianas. Este efecto inhibitor o estimulante es dependiente de la concentración del metabolito de interés en el medio de cultivo. Entre las moléculas que pueden actuar como reguladores se encuentran ácidos carboxílicos, aminoácidos y otros compuestos. Sin embargo, todos esos exometabolitos son componentes de bajo peso molecular (Vakhitov-Petrov, 2006). A diferencia, en nuestro estudio el componente que pudiera estar involucrado como posible “activador” se encuentra dentro del rango >100 kDa, por lo que, en el caso de *A. vinelandii* son necesarios más estudios al respecto que apoyen las hipótesis planteadas anteriormente.

6.2.2 PAPEL DEL ALGINATO PROVENIENTE DEL INÓCULO SOBRE LA PRODUCCION Y PESO MOLECULAR DEL POLÍMERO SINTETIZADO EN CULTIVOS DE *A. vinelandii*

En esta sección se presentan los resultados sobre la producción de alginato en los cultivos control, así como en cultivos inoculados con los diferentes sobrenadantes. La figura 6.10 presenta la cinética de producción de alginato, con las dos diferentes formas de inoculación en los cultivos control. Se observa que no existen diferencias significativas ($P = 0.03$) entre ambos cultivos, obteniéndose una producción máxima en promedio de 2.01 ± 0.2 g/L de alginato. Estos resultados contrastan con el reportado por Trujillo-Roldán *et al.* (2003a), quienes encontraron diferencias claras en la producción máxima de alginato, entre ambas formas de inoculación; obteniendo la mayor producción del polímero en cultivos inoculados convencionalmente con células sin lavar (4.8 g/L) con respecto a los cultivos inoculados con células lavadas (3.5 g/L) (tabla 6.5).

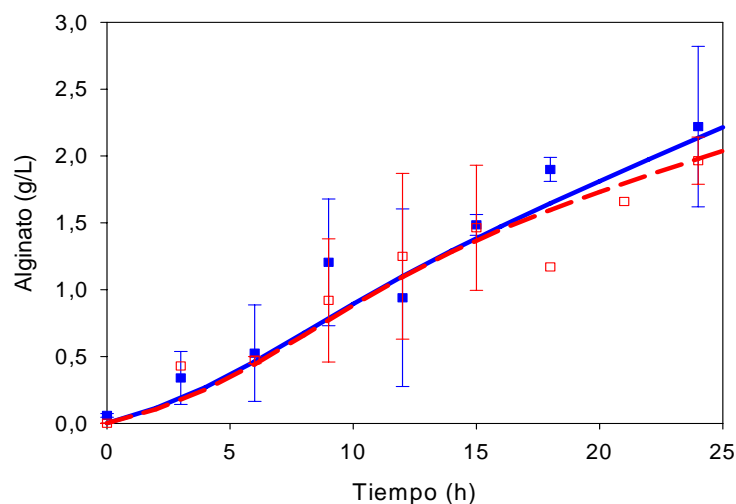


Figura 6.10. Cinéticas de producción de alginato en cultivos de *A. vinelandii* en fermentador, desarrollados bajo dos formas de inoculación. ■ —SL: células sin lavar. □ —Lv: células lavadas.

Tabla. 6.5. Parámetros cinéticos más importantes de los cultivos realizados bajo dos formas de inoculación, y su comparación con los reportados por Trujillo-Roldán *et al.* 2003a.

Parámetro cinético	Forma de Inoculación			
	Sin lavar [§]	Lavadas [§]	Inoculación convencional*	Células Lavadas*
Rendimiento, $Y_{p/x}$ ($\text{g}_{\text{alg}}/\text{g}_{\text{cel}}$)	1.08	1.02	1.20	1.16
Productividad específica de alginato, ($\text{g}_{\text{alg}}/\text{g}_{\text{cel}}\text{h}$)	0.04	0.04	0.06	0.04
Concentración máxima de alginato, ($\text{g}_{\text{alg}}/\text{L}$)	2.2	1.8	4.8	3.5

[§] Este trabajo; * Trujillo-Roldán *et al.* 2003a.

Cabe resaltar que los experimentos realizados en el trabajo de Trujillo-Roldán *et al.* (2003a) y los reportados en este trabajo, se realizaron bajo las mismas condiciones de cultivo y de separación celular. Siendo, la única diferencia entre ambos trabajos, el bioreactor utilizado, ya que en el trabajo anterior (Trujillo-Roldán *et al.* 2003a), los cultivos se llevaron a cabo en un bioreactor Virtis de 1.5 L, con un volumen de trabajo de 1.0 L, equipado con dos turbinas tipo Rushton ($D_i/D_t = 0.5$) de seis paletas planas (las cuales no presentan el disco central) y un difusor de 5 orificios.

A diferencia del trabajo referido anteriormente, en el presente trabajo los cultivos se realizaron en un bioreactor Applikon de 3 L, con un volumen de trabajo de 2 L, con dos turbinas Rushton ($D_i/D_t = 0.35$) de seis paletas planas y un difusor de 7 orificios. Por lo que existen diferencias geométricas entre ambos bioreactores utilizados, alterando las propiedades hidrodinámicas del sistema. Esto a su vez, se ve reflejado en el coeficiente de transferencia de oxígeno del sistema (k_La), teniendo un k_La menor en el bioreactor Virtis (54 h^{-1}) que en el bioreactor Applikon (75 h^{-1}). Por lo que éstas diferencias en el k_La pudieran estar influyendo en el comportamiento observado en ambos estudios. Sabemos que la producción de alginato y su peso molecular se ven afectados por la tensión de oxígeno disuelto, así como por la velocidad de agitación, donde el proceso de polimerización es dependiente de la tensión de oxígeno disuelto (Peña *et al.* 2000; Trujillo-Roldán *et al.* 2004). Asimismo, se sabe que la concentración de oxígeno disuelto en el medio puede regular varias de las enzimas y genes biosintéticos involucrados en la síntesis de alginato en *P. aeruginosa* (Leitão y Sá-Correia, 1997).

La figura 6.11 muestra la cinética de producción del polímero, en los cultivos con diversos sobrenadantes. La línea verde representa los cultivos donde se añadió el sobrenadante libre de alginato ($\blacktriangle LA$), y su comparación con los cultivos control descritos anteriormente ($—SL$ y $—Lv$). Se puede observar que no existen diferencias ($P = 0.048$) en la producción de alginato en los cultivos inoculados con el sobrenadante de la cepa mutante, con respecto a los controles. Es claro que la ausencia de alginato en el inóculo (LA), no afecta la concentración máxima del polímero, sintetizado durante el cultivo, ya que se presentan valores similares en todos los cultivos ($2.2 \pm 0.2 \text{ g/L}$) (tabla 6.6).

En la misma figura 6.11 se presenta la producción de alginato en los cultivos inoculados con las dos fracciones provenientes del sobrenadante (≤ 100 y $\leq 5 \text{ kDa}$) y su comparación con los cultivos control (células lavadas y células sin lavar). Se puede observar que la utilización de las fracciones de dos cortes moleculares distintos, provenientes del sobrenadante ($\blacklozenge CF5$ y $\blacklozenge CF100$), afecta negativamente la síntesis de alginato (0.95 y 1.24 g/L , respectivamente) comparados con las otras condiciones de inoculación probadas (2.01 g/L) (tabla 6.6).

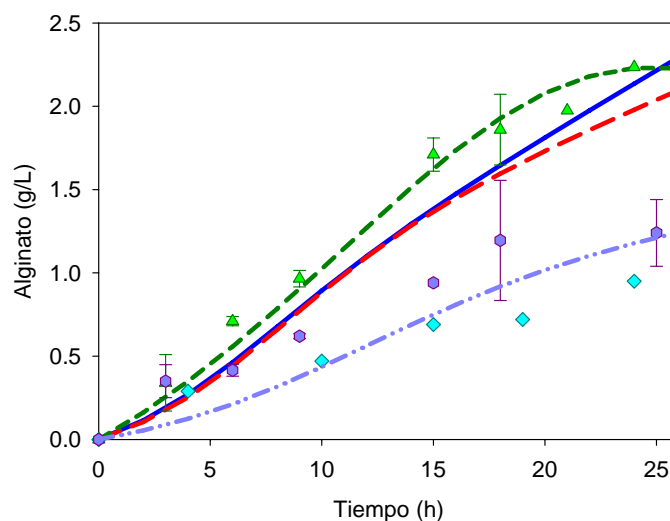


Figura 6.11 Cinéticas de producción de alginato, en cultivos de *A. vinelandii* en fermentador, desarrollados bajo dos formas de inoculación, y su comparación con los cultivos inoculados con diferentes sobrenadantes. Controles: — *SL*: células sin lavar; — *Lv*: células lavadas. ▲ — *LA*: inóculo libre de alginato. Fracciones provenientes de la cepa parental: ◆ — *CF5*, fracción menor o igual a 5 kDa, y ● — *CF100*: fracción menor o igual a 100 kDa.

Tabla. 6.6. Parámetros cinéticos más importantes de los cultivos realizados bajo dos formas de inoculación, y su comparación con los cultivos inoculados con distintos suplementos.

Parámetro cinético	Forma de Inoculación				
	Sin Lavar (<i>SL</i>)	Lavadas (<i>Lv</i>)	Sin alginato (<i>LA</i>)	≤5 kDa (<i>CF5</i>)	≤100 kDa (<i>CF100</i>)
Rendimiento, $Y_{p/x}$ (g_{alg}/g_{cel})	1.08	1.02	1.15	0.66	0.63
Productividad específica de alginato, ($g_{alg}/g_{cel}h$)	0.04	0.04	0.04	0.06	0.07
Concentración máxima de alginato, (g_{alg}/L)	2.2	1.8	2.2	0.9	1.2

Estos datos sugieren que la fracción ≤ 5 kDa (la cual está incluida en la fracción ≤ 100 kDa) contenida en el sobrenadante, puede estar involucrada en la regulación negativa de la síntesis de alginato. Los componentes de esta fracción (en ausencia de los otros componentes del sobrenadante), excepto el alginato, parece ser la responsable de la disminución en la síntesis del polímero, ya que su interacción con los demás componentes restantes del inóculo (células sin

lavar, *SL*) o la ausencia de dicha fracción (células lavadas, *Lv*), no afectan la síntesis del polímero.

Hasta el momento se puede concluir que el alginato presente en el inóculo no es necesario para la producción del polímero. Y que algún componente (no alginato) presente en la fracción ≤ 5 kDa actúa como un posible “agente represor” de la síntesis de alginato.

6.2.2.1 PESO MOLECULAR DEL POLIMERO SINTETIZADO EN CULTIVOS DE *A. vinelandii*

Se realizaron análisis de los pesos moleculares promedio (PMP) del alginato aislado de cada uno de los cultivos, llevados a cabo bajo las dos formas de inoculación (control y con diferentes suplementos).

En la figura 6.12 se presentan los PMP de los cultivos control (células lavadas y células sin lavar). El tipo de inoculación impacta el PMP del alginato sintetizado, siendo mayor para el caso de los cultivos inoculados con células lavadas (\square *Lv*).

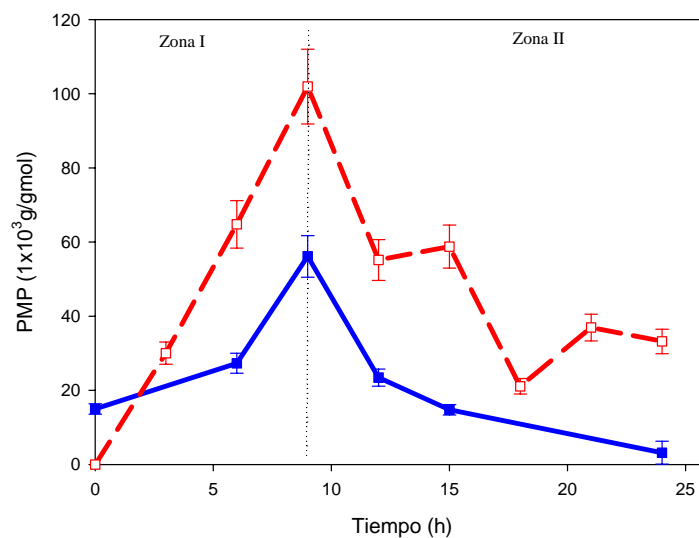


Figura 6.12 Pesos moleculares promedio de cultivos en fermentador, bajo condiciones controladas de oxígeno disuelto y pH. ■ *SL*, Células sin lavar. □ *Lv*, Células lavadas.

Lo anterior es comparable con lo reportado previamente por Trujillo-Roldán *et al.* 2003a, quienes encontraron que en cultivos llevados a cabo con células lavadas, se observa la síntesis de alginato de mayor peso molecular. En la misma figura, se puede observar que en plena fase de crecimiento (9 h de cultivo), bajo las dos formas de inoculación, se obtiene el mayor PMP para ambos cultivos, siendo mayor (101 kDa) en los cultivos inoculados con células lavadas, que para aquellos cultivos inoculados con células sin lavar (58 kDa) (Fig. 6.12, Zona I). Al final de ambos cultivos, se observó una caída en el PMP del polímero (Fig. 6.12, Zona II), debido seguramente a una depolimerización del alginato, realizada por la actividad alginasa presente en el sobrenadante (Peña *et al.* 2000). Se ha reportado que la enzima AlgL es la responsable de la caída en los pesos moleculares al final de los cultivos, llevados a cabo bajo condiciones controladas de oxígeno disuelto y pH (Trujillo-Roldán *et al.* 2003b).

En la figura 6.13 se presentan los pesos moleculares promedio del alginato que produce *A. vinelandii* en los cultivos inoculados con el sobrenadante de la cepa mutante, no productora de alginato ($\blacktriangle LA$), comparados con los cultivos control ($\text{— } SL$ y $\text{— } Lv$). Como se describió anteriormente, se obtuvieron los pesos moleculares promedio más bajos en los cultivos con inoculación convencional (conteniendo alginato y demás componentes, SL), que en las otras formas de inoculación evaluadas (sin alginato ni los demás componentes, Lv). Por otra parte, en los cultivos inoculados con el sobrenadante sin alginato, pero con los demás componentes del inóculo ($\blacktriangle LA$), se produce un alginato con un PMP máximo de 400 kDa. Lo anterior indica que, en los cultivos donde no está presente el alginato en la inoculación ($\text{— } Lv$ y $\blacktriangle LA$), el alginato que se sintetiza es de mayor peso molecular (mayor a 100 kDa) que aquellos donde el inóculo contiene alginato ($\text{— } SL$) (50 kDa).

Hasta el momento no sabemos cómo el alginato presente en el inóculo pueda estar influenciando en el peso molecular del alginato producido por la célula a través del cultivo. Sabemos que la tensión de oxígeno disuelto en el medio de cultivo, así como la velocidad de agitación impactan sobre las enzimas involucradas en la polimerización del alginato, por lo tanto afectando su peso molecular (Trujillo-Roldán *et al.* 2004), por lo que en nuestros experimentos se controlaron dichos parámetros para exclusivamente observar el efecto de los componentes del inóculo sin interferencia.

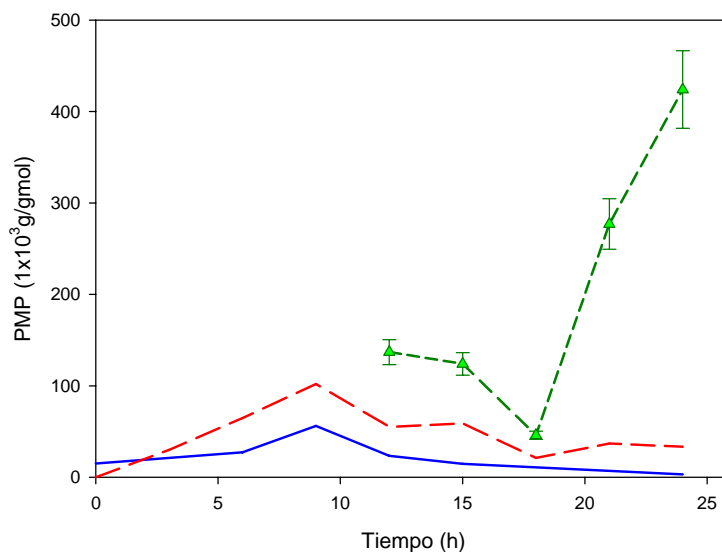


Figura 6.13. Pesos moleculares promedio de alginatos de *A. vinelandii* en cultivos en fermentador, desarrollados bajo dos formas de inoculación, y su comparación con los cultivos inoculados sin alginato. Controles: —SL: células sin lavar. - - Lv: células lavadas. ▲ - -LA: inóculo libre de alginato.

Una posible explicación es que el alginato pueda estar operando como una barrera quelante de algún posible “agente activador” del peso molecular del alginato obtenido. Y el alginato puede actuar como una barrera difusional en contra metales pesados, oxígeno y otros constituyentes del medio, además de proveer a la bacteria con una cubierta hidrofóbica (negativamente cargada) la cual la protege contra condiciones ambientales adversas (Sabra *et al.* 2001).

Por lo tanto, en los cultivos con inoculación convencional, en donde se encuentra presente el alginato desde el momento de la inoculación, el polímero pudiera estar actuando como un elemento quelante de algún componente(s) proveniente del sobrenadante o que este siendo sintetizado en la etapas iniciales del cultivo. Dicho componente(s) estaría actuando como “activador” del peso molecular del alginato. En *P. aeruginosa* se ha observado que concentraciones óptimas de cationes como Mn^{2+} , Mg^{2+} y Ca^{2+} presentes en el medio de cultivo pueden estimular la síntesis de alginato (Martins *et al.* 1990).

Dicho “efecto quelante” del alginato, se libera cuando se elimina el polímero del inóculo (inoculación con el sobrenadante de la cepa no productora de alginato, LA), observándose

pesos moleculares altos. Dejando así el libre acceso del “agente activador” hacia la célula, al momento de la inoculación.

En este contexto, Chan *et al.* (2005) reportaron que el alginato (polisacárido aniónico) es capaz de inducir cambios conformacionales en varios péptidos. Los péptidos utilizados muestran alta hidrofobicidad por lo que se insertan espontáneamente en membranas bacterianas y presentan actividad antimicrobiana. Observaron también que el alginato es capaz de secuestrar péptidos hidrofóbicos antes de que puedan alcanzar la membrana bacteriana, y por lo tanto reducir su actividad antimicrobiana. Así mismo, el alginato es capaz de formar complejos con péptidos catiónicos. Pudiendo ser en nuestro caso, el alginato un buen “agente quelante” del “activador” del peso molecular, presente en el sobrenadante de *A. vinelandii*.

Posteriormente, se realizaron análisis del peso molecular promedio en cultivos con fracciones menores a 100 y 5 kDa, que a continuación se presentan.

En la figura 6.14 se muestran los pesos moleculares del alginato obtenido en los cultivos inoculados con las fracciones del sobrenadante (◆CF5 y ●CF100). Se puede observar que, los cultivos inoculados con las fracciones del sobrenadante, presentan una tendencia similar a los experimentos anteriores (cultivos control y cultivos libres de alginato), con un máximo de PMP (256 y 228 kDa, respectivamente) y la caída del mismo al final del cultivo (104 y 27 kDa, respectivamente). Como previamente se mencionó, dicha caída es debida a alginasas presentes en el medio generadas por la bacteria (Peña *et al.* 2000, Trujillo- Roldán *et al.* 2004).

Los resultados anteriores indican que, cuando a los cultivos se añaden fracciones de diferentes pesos moleculares, provenientes del inóculo (◆CF5 y ●CF100), se alcanzan pesos moleculares superiores a los que se obtienen con la inoculación convencional (■SL), pero por debajo de los obtenidos en los cultivos donde se eliminó el alginato (▲LA). Con lo anterior se infiere que las fracciones del sobrenadante de peso molecular bajo (menores a 100 kDa), pudieran contener el “agente activador” de la polimerización del alginato.

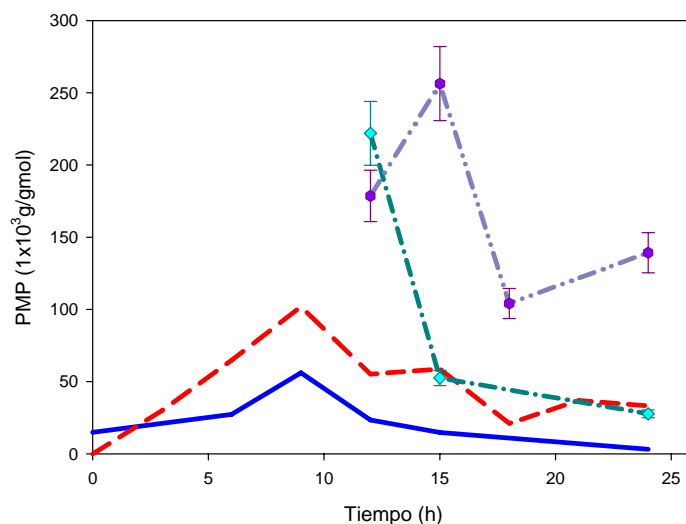


Figura 6.14. Pesos moleculares promedio de alginatos de *A. vinelandii* en cultivos en fermentador, desarrollados bajo diferentes formas de inoculación, y su comparación con los cultivos control. Controles: —SL: células sin lavar; —Lv: células lavadas. Fracciones provenientes del sobrenadante: ◆ —CF5, menor o igual a 5 kDa; ● —CF100: fracción menor o igual a 100 kDa.

La presencia de alginato de peso molecular intermedio entre 100-5 kDa, presente en las fracciones menores a 100 y 5 kDa, pudiera aún funcionar como agente quelante del posible “activador” presente en el inóculo o sintetizado por las células al inicio del cultivo.

6.2.3 IMPACTO DEL SOBRENADANTE SOBRE EL CONSUMO DE SACAROSA EN CULTIVOS DE *A. vinelandii*

Fueron encontradas diferencias importantes al realizar el análisis del consumo de sacarosa en todos los cultivos. Las tendencias en los consumos de sacarosa donde se utilizaron células lavadas para la inoculación de los cultivos, presentan analogía con lo anteriormente demostrado en los cultivos realizados sin condiciones controladas de oxígeno (matraces agitadas). Las diferencias estriban en el menor consumo de sacarosa en los cultivos donde se utilizaron células sin lavar (SL) que en aquellos inoculados con células lavadas (Lv, LA, CF5 y CF100). Las particularidades de cada caso se presentan a continuación.

La figura 6.15 muestra la cinética de consumo de sacarosa en los cultivos control. En esta figura se observa una diferencia significativa en los perfiles de consumo de sustrato, ya que en los cultivos inoculados con células sin lavar, presentan una velocidad específica de consumo de sacarosa menor ($0.43 \text{ g}_{\text{sac}}/\text{g}_{\text{cél}}\text{h}$) que en los cultivos inoculados con células lavadas ($0.97 \text{ g}_{\text{sac}}/\text{g}_{\text{cél}}\text{h}$), (tabla 6.7).

Al igual que en los cultivos en matraces (condiciones no controladas de oxígeno y pH), la ausencia de algún metabolito proveniente del sobrenadante, causa un aumento en la velocidad específica de consumo, en los cultivos realizados con células lavadas (L_v).

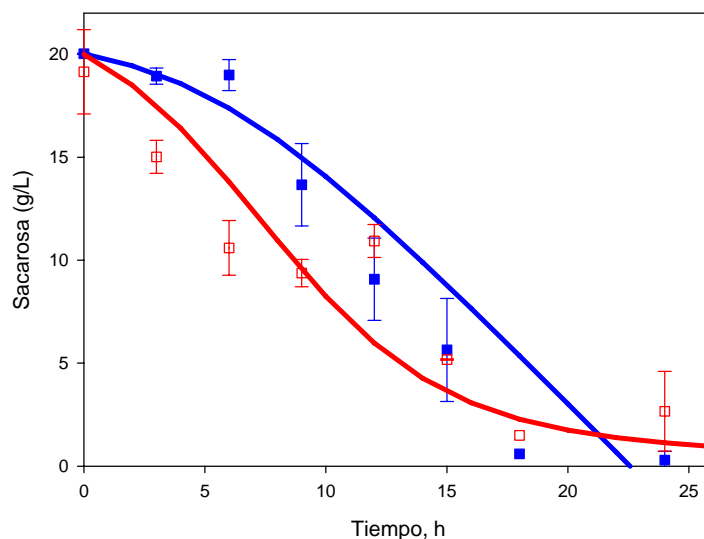


Figura 6.15. Cinética de consumo de sacarosa de *A. vinelandii* en cultivos en fermentador, 24 h. ■ — SL : células sin lavar. □ — L_v : células lavadas. Las líneas representan la tendencia.

Tabla. 6.7. Parámetros cinéticos más importantes de los cultivos realizados bajo dos formas de inoculación, y su comparación con los cultivos inoculados: sin alginato y con la fracción ≤ 100 proveniente del sobrenadante.

Parámetro cinético	Forma de Inoculación			
	Sin lavar (SL)	Lavadas (L_v)	Sin alginato (LA)	≤ 100 kDa ($CF100$)
Velocidad específica de consumo de sustrato, ($\text{g}_{\text{sac}}/\text{g}_{\text{cél}}\text{h}$)	0.43	0.97	0.87	0.83

La figura 6.16 muestra la cinética de consumo de sacarosa en los cultivos libres de alginato (*LA*) y su comparación con los cultivos control (\blacksquare *SL* y \square *Lv*). La velocidad de consumo de sacarosa, en los cultivos inoculados con el sobrenadante libre de alginato (\blacktriangle *LA*) fue mayor ($0.87 \text{ g}_{\text{sac}}/\text{g}_{\text{cél}}\text{h}$) que la tasa de consumo observada en los cultivos con inoculación convencional con células sin lavar ($0.43 \text{ g}_{\text{sac}}/\text{g}_{\text{cél}}\text{h}$), y fue muy parecida a aquellas estimadas para los cultivos en donde se utilizaron células lavadas ($0.97 \text{ g}_{\text{sac}}/\text{g}_{\text{cél}}\text{h}$) como inóculo (tabla 6.7). Lo descrito anteriormente sugiere que el alginato presente en la inoculación pudiera ser el responsable de una menor velocidad de consumo de sacarosa.

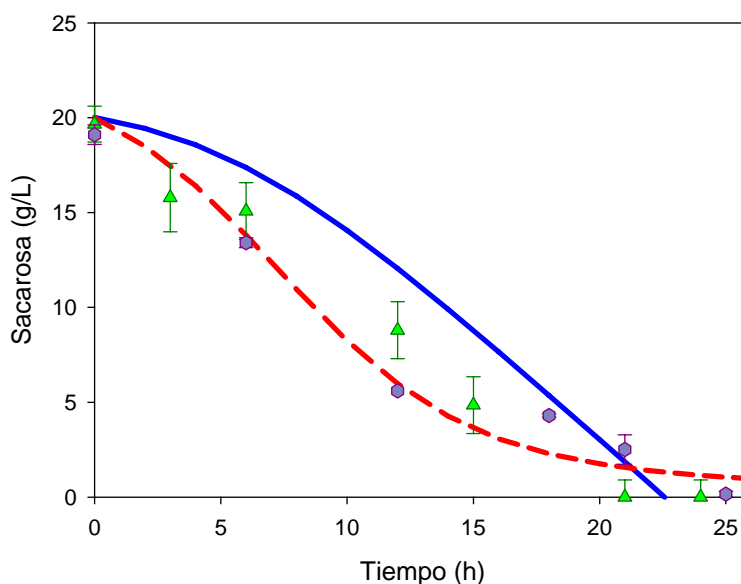


Figura 6.16. Cinéticas de consumo de sacarosa de cultivos de *A. vinelandii* desarrollados bajo dos formas de inoculación, y su comparación con los cultivos inoculados sin alginato. Controles: —*SL*: células sin lavar. - -*Lv*: células lavadas. \blacktriangle *LA*: inóculo libre de alginato. \bullet *CF100*: fracción menor o igual a 100 kDa, proveniente de la cepa parental

Por otra parte, en la misma figura se muestra la cinética de consumo de sacarosa durante los cultivos realizados con la fracción ≤ 100 kDa proveniente del sobrenadante (\bullet *CF100*) y de los cultivos control (—*SL* y - -*Lv*). Se observa que, en los cultivos inoculados con la fracción del sobrenadante ≤ 100 kDa, se presenta una velocidad específica de consumo ($0.83 \text{ g}_{\text{sac}}/\text{g}_{\text{cél}}\text{h}$) de tendencia similar a la reportada para cultivos con células sin lavar ($0.97 \text{ g}_{\text{sac}}/\text{g}_{\text{cél}}\text{h}$), (tabla 6.7).

Con lo descrito anteriormente podemos inferir que el alginato de >100 kDa presente en el inóculo pudiera ser el responsable del menor consumo en cultivos inoculados con células sin lavar (—SL), ya que en cultivos inoculados sin la fracción mayor a 100 kDa (— —Lv y ●CF100) se presentan velocidades de consumo mayores. Como previamente se demostró (matraces convencionales), la centrifugación de las células no es la responsable de los cambios en el consumo de sacarosa. En la sección anterior (6.2.2) se describió un posible mecanismo sinérgico entre el alginato con los demás componentes del inóculo. En este contexto, el alginato pudiera estar actuando como un agente quelante de algún elemento regulador del consumo de sacarosa por las células. Por lo que serán necesarios mas estudios para poder determinar si en la fracción >100 kDa se encuentra el posible regulador del consumo en cultivos de *A. vinelandii*.

6.3 Corolario

Al parecer, en *A. vinelandii* la regulación del crecimiento celular y el mayor peso molecular del alginato sintetizado, pueden ser provocados indirectamente por el alginato de alto peso molecular (>100 kDa).

Como anteriormente se presentó, en los cultivos inoculados con alginato (*SL*) se presenta el mayor crecimiento bacteriano, así como el menor peso molecular promedio para el alginato sintetizado bajo esta condición (Fig. 6.17.a). Asimismo, bajo las condiciones de inoculación donde no se encuentra presente el alginato de alto peso molecular (*Lv*, *LA*, *CF5* y *CF100*) se reprime el crecimiento bacteriano y favorece la síntesis de alginatos con altos pesos moleculares (Fig. 6.17.b).

Este polímero pudiera estar jugando un papel de barrera, para posibles moléculas represoras del crecimiento bacteriano y activadoras del peso molecular.

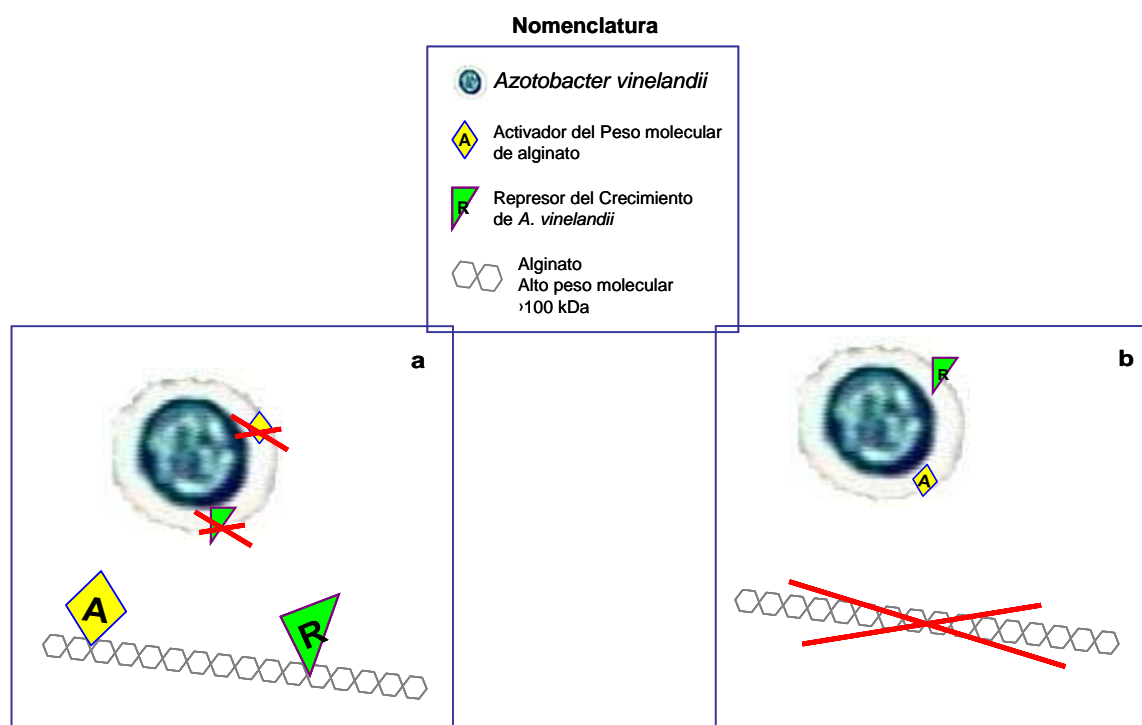


Figura 6.17. Modelo de acción propuesto para el alginato presente en el inóculo (a) y ausente del inóculo (b).

VII. CONCLUSIONES

- El procedimiento de inoculación influye determinantemente en el desempeño de los cultivos de *A. vinelandii* productores de alginato.
- Inoculando el cultivo con células lavadas (libres de sobrenadante), se ven afectados negativamente tanto la velocidad de crecimiento (disminución del 80 %) como el consumo de sacarosa (aumento del doble) en cultivos de *A. vinelandii*. Asimismo, impacta positivamente sobre el peso molecular del alginato sintetizado (duplicando el peso molecular).
- Por otra parte, la alginasa AlgL (componente del sobrenadante) no parecen estar determinando la concentración de alginato y su peso molecular. Además, todo indica que no determinan la menor tasa de crecimiento bacterial de los cultivos.
- Los oligosacáridos de alginato (componentes del sobrenadante) no son los responsables de la mayor concentración de alginato ni de los altos pesos moleculares.
- En contraste, el alginato (componente del sobrenadante) parece ser el responsable de las mayores velocidades de crecimiento y de los menores consumos de sacarosa por la bacteria, en cultivos llevados a cabo bajo condiciones controladas de oxígeno y pH. Asimismo, el alginato pudiera tener un papel de autorregulador en la biosíntesis, a través de una acción de barrera de posibles metabolitos reguladores del crecimiento y consumo de sacarosa.
- De las diversas fracciones del sobrenadante analizadas, aquellas con corte molecular ≤ 100 kDa, podrían contener un posible “agente inductor” del peso molecular del polímero sintetizado.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- Annison, G., Couperwhite, I. (1986) Influence of calcium on alginate production and composition in continuous cultures of *Azotobacter vinelandii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25: 55-61.
- Ariyo, B.T., Bucke, C., Keshavarz, T. (1997) Alginate oligosaccharides as enhancers of penicillin production in cultures of *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol. Bioeng.* 53: 17-20.
- Ariyo, B.T., Tamerler, C., Bucke, C., Keshavarz, T. (1998) Enhanced penicillin production by oligosaccharides from batch cultures of *Penicillium chrysogenum* in stirred-tank reactors. *FEMS. Microbiol. Lett.* 166: 165-170.
- Asylonu, E., Bucke, C., Keshavarz, T. (2000) Enhancement of chrysogenin production in cultures of *Penicillium chrysogenum* by uronic acid oligosaccharides. *Biotechnol. Lett.* 22: 931-936.
- Akiyama, H., Endo, T., Nakakita, R., Murata, K., Yenemoto, Y., Okayama, K. (1992) Effect of depolymerised alginates on the growth of *Bifidobacteria*. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 56: 355-356.
- Bland, E.J., Keshavarz, T., Bucke, C. (2004) The influence of small oligosaccharides on the immune system. *Carbohydr. Res.* 339: 1673-1678.
- Blumenkrantz, N., Asboe-Hansen, G. (1973) New Method for quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biochem.* 54: 484-489.
- Boswell, C. (2002) Producers seek price increases in the nature alginates market. *Chem Market Reporter* 262: 10-11.
- Brivonese, A., Sutherland, I. W. (1989) Polymer production by a mucoid strain of *Azotobacter vinelandii* in batch culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 30: 97-102.
- Brownlee, I. A., Allen, A., Pearson, J. P., Dettmar, P. W., Havler, M. E., Atherton M. R., Onsøyen, E. (2005) Alginate as a source of dietary fiber. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 45: 497-510
- Cárdenas, A. (1997) Reología y asociación molecular en solución de poliuronatos de origen diverso. Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Sonora. Pág. 22-29.
- Chan, C., Burrows, L. L., Deber, C. M. (2005) Alginate as an auxiliary bacterial membrane binding of membrane-active peptides by polysaccharides. *J Pept. Res.* 65: 343-357.
- Clementi, F., Paolo, F., Mancini, F., Moresi, M. (1995) Optimal conditions for alginate production by *Azotobacter vinelandii*. *Enzyme Microb. Technol.* 17: 983-988.
- Clementi, F. (1997) Alginate production by *Azotobacter vinelandii*. *Crit. Rev. Biotechnol.* 17: 327-361.

- Clementi, F., Mancini, M., Moresi, M. (1998) Rheology of alginate from *Azotobacter vinelandii* in aqueous dispersions. *J. Food Eng.* 36: 51-62.
- Clementi, F., Crudele, M.A., Parente, E., Mancini, M., Moresi, M. (1999) Production and characterization of alginate from *Azotobacter vinelandii*. *J. Sci. Food Agric.* 79: 602-610.
- Crescenzi, V. (1995) Microbial polysaccharides of applied interest: on going research activities in Europe. *Biotechnol. Prog.* 11: 251-259.
- Cohen, G. H., Coon, G. A. (1953) Theoretical consideration of retarded control. *Trans. ASME.* 75: 827-834.
- Conti E., Flabiani A., O'Regan M., Shuterland I. (1994) Alginate from *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida*: production and properties. *Microbiol.* 140: 1125-1132.
- Davidson I.W., Sutherland I.W., Lawson, C.J. (1977) Localization of O-acetyl groups of bacteria alginate. *J. Gen. Microbiol.* 98: 603-606.
- Ertesvåg, H., Valla, S., Skjåk-Bræk, G. (1996) Genetic and biosynthesis of alginate. *Carbohydr. Eur.* 14: 14-18.
- Ertesvåg, H., Erlien, F., Skjåk-Bræk, G., Rehm, B.H.A., Valla, S. (1998) Biochemical properties and substrate specificities of a recombinantly produced *Azotobacter vinelandii* alginate lyase. *J. Bacteriol.* 180: 3779-3784.
- Galindo, E., Peña, C., Núñez, C., Segura, D., Espín, G. (2007) Molecular and bioengineering strategies to improve alginate and polyhydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii*. *Microbial Cell Factories* 6:7.
- Gacesa, P. (1998) Bacterial alginate biosynthesis- Recent progress and future prospects. *Microbiol.* 114: 1133-1143.
- Gorin, P.A., Spencer, J.F.T. (1966) Exocellular alginic acid from *Azotobacter vinelandii*. *Can. J. Chem.* 44: 993-998.
- Hassett, D.J. (1996) Anaerobic production of alginate by *Pseudomonas aeruginosa*: alginate restricts diffusion of oxygen. *J. Bacteriol.* 178: 7322-7325.
- Iwamoto, Y., Xu, Xu, Tamura, T., Oda, T., Muramatsu, T. (2003) Enzymatic depolymerized alginate oligomers that cause cytotoxic cytokine production in human mononuclear cells. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 67: 258-263.
- Kennedy, C., Toukdarian, A. (1987) Genetics of *Azotobacters*: applications to nitrogen fixation and related aspects of metabolism. *Annu. Rev. Microbiol.* 41: 227-258.
- Kenendy C., McDowell K., Sutherland, I. (1992) Alginases from *Azotobacter* species. *J. Gen. Microbiol.* 138: 2465-2471.

- Leitão, J. H., 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, T.Y., Hassid, W.Z. (1966) Isolation of guanosine diphosphate uronic acids from marine brown alga, *Fucus gardneri* Silva. *J. Biol. Chem.* 24: 3283-3296.
- Luna, C.L., Silva, G.R., Rios E.M.M. (2004) *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* production involving re-use of the supernatant. *Biotechnol. Lett.* 26: 143-145.
- Luedeking, R., Piret, E. L. (1959) A kinetic study of a lactic acid fermentation batch process at controlled pH. *J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng.* 1: 393-412.
- Lynn, A.N, Sokatch, J.R. (1984) Incorporation of isotope from specially labelled glucose into alginates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* 158: 1161-1162.
- Martins, L. O., Brito, L. C., Sá-Correia, I. (1990) Roles of Mn^{2+} , Mg^{2+} y Ca^{2+} on alginate biosíntesis by *Pseudomonas aeruginosa*. *Enzyme Microbiol. Technol.* 12: 794-799.
- Miller, G. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.* 31: 426-428.
- Moe, ST., Draget, K.I., Skjåk-Bræk, G., Smidrod, O. (1995) Alginates, In: Food polysaccharides and applications. A.M. Stephen, (ed.), Marcel Dekker, New York, pp. 245-286.
- Otterieri, M., Østgaard, K., Skjåk-Bræk, G., Smidsrød, O., Soon-Shiong, P., Espevik, T. (1991) Induction of cytokine production from human monocytes stimulated with alginate. *J. Immunother.* 10: 286-291.
- Parente, E., Crudele, M.A., 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, M., Galindo, E. (2000) Influence of dissolved oxygen tension and agitation speed on alginate production and its molecular weight in cultures of *Azotobacter vinelandii*. *Enzyme Microbiol. Technol.* 27: 390-398.
- Pindar, D.F, Bucke, C. (1975) The biosynthesis of alginic acid by *Azotobacter vinelandii*. *Biochem. J.* 152: 617-622.
- Priego, R., Peña, C., Ramirez, O. T., Galindo, E. (2005) Specific growth rate determines the molecular mass of the alginate produced by *Azotobacter vinelandii*. *Biochem. Engine. J.* 25: 187-193.

- Pszczola, D.E. (1998) Discovering treasures of the deep. *Food Technol.* 52: 74-80.
- Remminghorst, U., Rhem, B. H, A. (2006) Bacterial alginates, from biosynthesis to applications. *Biotechnol. Lett.* 21:1701-1712.
- Rhem, B.H., Valla, S. (1997) Bacterial alginates. Biosynthesis and applications. *Applied Microbiol. Biotechnol* 48: 281-288.
- Sabra W., Sabry, S., Omar, S., Deckwer, W.D. (1999) Effect of phosphate and oxygen concentrations on alginate production and stoichiometry of metabolism of *Azotobacter vinelandii* under microbiaerobic conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52: 773-780.
- Sabra W.A., Zeng, A-P., Lünsdorf H., Deckwer W-D. (2000) Function and variation of alginate production in *Azotobacter vinelandii* under nitrogen fixation conditions. *Appl. Environ. Microbiol* 66: 4037-4044.
- Sabra, W., Zeng, A. P., Decker, W. D. (2001) Bacterial alginate: physiology, product quality and process aspects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56: 315-325.
- Séañez G., Peña, C., Galindo, E. (2001) High CO₂ effects alginate production and prevents polymer degradation in cultures of *Azotobacter vinelandii*. *Enzyme Microbiol. Technol.* 29: 535-540.
- Segura, D., Guzmán, J., Espín, G. (2003) *Azotobacter vinelandii* mutants that over produce poly-b-hydroxybutyrate or alginate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63: 159-163.
- Skjåk-Bræk, G. (1992) Alginate: biosynthesis and some structure function relationships relevant to biomedical and biotechnological applications. *Trasactions-Biochem. Soc.* 20: 27-33.
- Skjåk-Bræk, G., Espevik, T. (1996) Application of alginate gels in biotechnology and biomedicine. *Carbohydr. Eur.* 14: 19-25.
- Sutherland, I. W. (1990) Biotechnology of microbial exopolysaccharydes. Cambridge University Press, pp. 156.
- Tinoco, J.R. (1993) Obtención de alginatos bacterianos por fermentación líquida de *Azotobacter vinelandii*. *Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas*. Instituto de Biotecnología, UNAM. Pág. 30-36.
- Tomoada, Y., Umemura, K., Adachi, T. (1994) Promotion of barley root elongation under hypoxic conditions by alginate lyase-lysate. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58: 202-203.
- Trujillo, M. A. (1999) Efecto de las oscilaciones en el oxígeno disuelto sobre la producción de alginatos por *Azotobacter vinelandii*. *Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas*. Instituto de Biotecnología, UNAM. Pág. 25-40.

- Trujillo, M. A. (2003) 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 de Doctorado en Ciencias Bioquímicas*. Instituto de Biotecnología, UNAM. Pág. 37-76.
- Trujillo-Roldán, M. A., Peña, C., Ramírez, O. T., Galindo, E. (2001) Effect of oscillating dissolved oxygen tension on the production of alginate by *Azotobacter vinelandii* *Biotechnol. Prog.* 17: 1042-1048.
- Trujillo-Roldán, M. A., Peña, C., Galindo, E. (2003a) Components in the inoculum determine the kinetics of *Azotobacter vinelandii* cultures and the molecular weight of its alginate. *Biotechnol. Lett.* 25: 1251-1254.
- Trujillo-Roldán, M.A., Moreno, S., Galindo, E., Espín, G. (2003b) Alginate production by an *Azotobacter vinelandii* mutant unable to produce alginate lyase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60: 733-737.
- Trujillo-Roldán, M.A., Moreno, S., Espín, G., Galindo, E. (2004). Roles of the oxygen and alginate-lyase in determining the molecular weight of alginate produced by *Azotobacter vinelandii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63: 742-747.
- Vakhitov, T. Ya., Petrov, L. N. (2006) Regulatory functions of bacterial exometabolites. *Microbiol.* 75: 415-419.
- Wong, T. Y., Preston, L. A., Schiller, N. L. (2000). Alginate lyase: A review of major sources and enzyme characteristics, structure-function analysis, biological roles and applications. *Annu. Rev. Microbiol.* 54: 289-340.
- Yonemoto, Y., Tanaka, H., Yamashita, T., Kitabatake, N., Ishida, Y., Kimura, A., Murata, K. (1993) Promotion of germination and shoot elongation of some plants by alginate oligomers prepared with bacterial alginate lyase. *J. Ferment. Bioeng.* 75: 68-70.
- Ziegler, J.G, Nichols, N. B. (1942) Optimum settings for automatic controllers. *Trans. ASME* 64: 759-768.