



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**

**LA ACETILACIÓN DE LOS ALGINATOS SINTETIZADOS POR *AZOTOBACTER VINELANDII* EN FUNCIÓN DE LA TENSIÓN DE OXÍGENO DISUELTO Y DE LA VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO**

## **TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO ACADÉMICO DE**

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A**

**TANIA CASTILLO MARENCO**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**DR. CARLOS F. PEÑA MALACARA, IBT UNAM**

**INTEGRANTES DEL COMITÉ TUTOR:**

**DRA. CINTHIA E. NÚÑEZ LÓPEZ, IBT UNAM Y DR. ÁLVARO R. LARA RODRÍGUEZ,  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**CUERNAVACA, MORELOS**

**NOVIEMBRE, 2013**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Ingeniería Celular y Biotatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Carlos F. Peña Malacara, en el grupo del Dr. Enrique Galindo Fentanes. Durante la realización del mismo se contó con el apoyo de la beca de doctorado (16271) otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT). También se contó con el financiamiento del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM, a través de los proyectos PAPIIT-UNAM: IN-110310, IT-100513 y el proyecto CONACyT: 131851.

---

## ÍNDICE GENERAL

Contenido	Páginas
Listado de siglas y abreviaciones	VI
Resumen	VII
Abstract	IX
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Estructura, propiedades y aplicaciones de los alginatos	3
2.2 <i>Azotobacter vinelandii</i> como modelo de producción de alginato	5
2.2.1 Generalidades de <i>A. vinelandii</i>	5
2.2.2 Metabolismo de <i>A. vinelandii</i>	8
2.2.3 Biosíntesis del alginato en <i>A. vinelandii</i>	9
2.2.4 Genes estructurales de la biosíntesis del alginato en <i>A. vinelandii</i> : localización y regulación	12
2.2.5 Biosíntesis de Poli-(3-hidroxibutirato) en <i>A. vinelandii</i>	14
2.3 Factores de cultivo que afectan la producción y composición del alginato producido por <i>A. vinelandii</i>	14
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	19
3.1 Hipótesis	19
3.2 Objetivos	19
4. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	20
5. MATERIALES Y MÉTODOS	21
5.1 Cepa	21
5.2 Medio de cultivo	21
5.3 Sistemas de cultivo	21
5.3.1 Cultivos en matraces	21
5.3.2 Cultivos en fermentador	22
5.4 Determinaciones analíticas	24
5.4.1. Crecimiento celular	24
5.4.2. Cuantificación de glucosa y ácidos orgánicos en el caldo de cultivo	25
5.4.3. Cuantificación de alginato	25
5.4.4. Cuantificación de grado de acetilación del alginato	26
5.4.5. Cuantificación de P3HB	26
5.5 Experimentos con marcaje isotopomérico	27
5.5.1 Hidrólisis de proteína	27

---

5.5.2 Derivatización	28
5.5.3 Cromatografía de gases –espectrometría de masas	28
5.5.4 Análisis de flujo metabólico ( <i>in silico</i> )	28
5.6. Análisis estadístico	28
5.7. Expresiones matemáticas	29
5.7.1 Expresiones matemáticas empleadas en los cultivos en lote	29
5.7.2 Expresiones matemáticas empleadas en los cultivos en quimiostato	30
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
6. 1 Estudio de la acetilación de los alginatos sintetizados por <i>A. vinelandii</i> sin control de la tensión de oxígeno disuelto y la velocidad específica crecimiento (cultivos en matraces agitados bajo diferentes condiciones de disponibilidad de oxígeno)	36
6.1.1 Condiciones de estudio: alta y baja disponibilidad de oxígeno	36
6.1.2 Crecimiento y consumo de glucosa	38
6.1.3 Producción de P3HB	39
6.1.4 Grado de acetilación del alginato y producción de alginato	40
6.1.5 Análisis de flujo metabólico	42
6.2 Estudio de la acetilación del alginato producido por <i>A. vinelandii</i> en condiciones controladas de TOD y velocidad específica de crecimiento	46
6.2.1 Intervalo de evaluación de TOD	46
6.2.2 Crecimiento y producción de P3HB	47
6.2.3 Producción de alginato en función de la TOD y velocidad específica de crecimiento: concentración, rendimientos y peso molecular promedio	48
6.2.4 Grado de acetilación del alginato en función de la TOD	51
6.2.5 Grado de acetilación del alginato en función de la velocidad específica de crecimiento	54
7. CONCLUSIONES	56
8. APORTACIONES Y PERSPECTIVAS	57
8.1 APORTACIONES	57
8.2 PERSPECTIVAS	57
9. REFERENCIAS	59
ANEXO I: PRODUCTOS GENERADOS	i
ANEXO II: PERFILES DE TENSIÓN DE OXÍGENO DISUELTO	v
ANEXO III: CROMATOGRAMAS CARACTERÍSTICOS DEL SOBRENADANTE EN CONDICIONES DIAZOTRÓFICAS	ix
ANEXO IV: MATERIAL ADICIONAL DELL ANÁLISIS DEL FLUJO METABÓLICO	xi

---

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Páginas
Figura 2.1. Estructura química característica de los alginatos bacterianos.	3
Figura 2.2. Microfotografía de un quiste maduro de <i>A. vinelandii</i>	7
Figura 2.3. Rutas metabólicas en <i>A. vinelandii</i> (Base de datos <i>Kyoto encyclopedia of genes and genomes KEGG</i> )	8
Figura 2.4. Modelo de la biosíntesis de alginato en <i>A. vinelandii</i> : ubicación espacial y proteínas participantes.	10
Figura 2.5. Modelo de la regulación de la expresión de los genes estructurales de la biosíntesis de alginato en <i>A. vinelandii</i> .	13
Figura 6.1. Perfil de oxígeno disuelto de los cultivos de <i>A. vinelandii</i> ATCC 9046 bajo condiciones de baja y alta disponibilidad de oxígeno	37
Figura 6.2. Cinéticas de crecimiento de <i>A. vinelandii</i> ATCC 9046 y de consumo de glucosa en condiciones de baja y alta disponibilidad de oxígeno	39
Figura 6.3. Cinética de producción de PHB en condiciones de baja disponibilidad de oxígeno	40
Figura 6.4. Grado de acetilación del alginato en condiciones de alta aireación y baja disponibilidad de oxígeno	41
Figura 6.5. Cinéticas de producción de alginato en condiciones de baja y alta disponibilidad de oxígeno	41
Figura 6.6. Mapa de flujo metabólico de <i>A. vinelandii</i> ATCC 9046 en $[1-^{13}\text{C}]$ - glucosa bajo condiciones de baja y alta disponibilidad de oxígeno	42
Figura 6.7. Perfiles de TOD característicos de los cultivos en quimiostato desarrollados a 1, 5 y 9 %	46
Figura 6.8. Concentración de biomasa total y contenido de PHB (p/p %) en los cultivos a 1, 5 y 9 % de TOD	48
Figura 6.9. Concentración de alginato y rendimientos de alginato con base en biomasa ( $Y_{\text{Alg}/X}$ ) en cultivos en quimiostato desarrollados a 1 y 9 % de TOD.	50
Figura 6.10. Grado de acetilación del alginato en cultivos en quimiostato desarrollados a 1 y 9 % de TOD.	52
Figura 6.11. Relación del grado de acetilación del alginato y la concentración de PHB en cultivos en quimiostato desarrollados a 1, 5 y 9 % de TOD.	53
Figura 6.12. Relación del grado de acetilación del alginato y el rendimiento de alginato $Y_{\text{Alg}/x}$ en cultivos en quimiostato desarrollados a 1, 5 y 9 % de TOD.	55

---

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Páginas</b>
Tabla 2.1. Aplicaciones tradicionales de los alginatos	4
Tabla 2.2. Composición de los alginatos en quistes de <i>A. vinelandii</i>	7
Tabla 2.3. Factores de cultivo que afectan la producción y composición del alginato producido por <i>A. vinelandii</i>	16
Tabla 5.1. Composición del medio de cultivo	21
Tabla 5.2. Valores de las constantes P, I y D del controlador digital universal UDC 1200 Micro Pro	23
Tabla 5.3. Descripción del método cromatográfico para la cuantificación de glucosa, acetilos y PHB.	26
Tabla 6.1 Parámetros cinéticos de los cultivos en matraces agitados bajo diferentes condiciones de aireación.	38
Tabla 6.2. Concentración promedio, rendimientos y peso molecular promedio del alginato a 1, 5 y 9 % de TOD.	49
Tabla 6.3. Velocidad de consumo de oxígeno, velocidad específica de consumo de oxígeno y coeficiente respiratorio en los cultivos a 1 y 9 % de TOD.	51
Tabla 6.4. Distribución de carbono.	53

---

## LISTADO DE SIGLAS Y ABREVIACIONES

### VARIABLES DE CULTIVO

RQ	Coeficiente respiratorio
TOD	Tensión de oxígeno disuelto
VTO	Velocidad de transferencia de oxígeno
VTO <sub>max</sub>	Velocidad de transferencia de oxígeno máxima
VCO	Velocidad de consumo de oxígeno
V	Volumen
D	Tasa de dilución
$\tau$	Tiempo de residencia
F	Flujo
$\mu$	Velocidad específica de crecimiento
$q_{O_2}$	Velocidad específica de consumo de oxígeno
$q_G$	Velocidad específica de consumo de glucosa

### METABOLITOS

ACA	Acetil-CoA
CoA	Coenzima A
DHA	Dihidroxiacetona
G6P	Glucosa-6-fosfato
GOX	Glioxilato
KDPG	Ceto-deoxi-fosfogluconato
PEP	Fosfoenolpiruvato
PYR	Piruvato
3PG	3- Fosfoglicerato
IC	Isocitrato
ICDH	Isocitrato deshidrogenasa
$\alpha$ -KG	$\alpha$ -cetoglutarato
FUM	Fumarato
OAA	Oxaloacetato
P3HB	Poli-(3-hidroxibutirato)
SUC	Succinato



## RESUMEN

Los alginatos bacterianos son exopolisacáridos conformados por los ácidos  $\alpha$ -D-manurónico y  $\beta$ -L-gulurónico, y pueden presentar O-acetilación en las posiciones O-2 y/o O-3 de los residuos de ácido manurónico. Estos polímeros se caracterizan por su capacidad de formar geles o soluciones de alta viscosidad; la presencia de grupos acetilo le proporciona propiedades importantes al polímero ya que incrementa la viscosidad de las soluciones de alginato, así como la turgencia de los geles.

Una alternativa para conseguir alginatos con una composición química definida es obtenerlos a partir de cultivos de *Azotobacter vinelandii* bajo condiciones de cultivo controladas. Esta bacteria del suelo es aerobia estricta y tiene la capacidad de sintetizar alginato y poli-(3-hidroxi-butirato) (P3HB). La composición de los alginatos sintetizados por *A. vinelandii* depende principalmente de las condiciones de cultivo; en el caso de la acetilación del alginato en estudios previos en matraces agitados, se observó que en condiciones de baja aireación la acetilación del alginato se incrementa con respecto al alginato que se produce en cultivos en alta aireación. Sin embargo, bajo estas condiciones de cultivo no es posible definir si los cambios observados en el grado de acetilación son resultado de la disponibilidad de oxígeno y/o de los cambios en la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ).

El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de la tensión de oxígeno disuelto (TOD) y/o la  $\mu$  sobre el grado de acetilación del alginato producido por *A. vinelandii* ATCC9046.

En una primera etapa se evaluó el grado de acetilación del alginato en cultivos en matraces agitados bajo dos condiciones de disponibilidad de oxígeno, denominadas de alta y baja disponibilidad de oxígeno, en los que además se evaluó el flujo de carbono empleando [ $^{13}\text{C}_1$ ]-Glucosa.

En esta etapa se demostró que la disponibilidad de oxígeno tiene un efecto importante sobre los flujos y la distribución de carbono. El flujo relativo en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) disminuyó hasta en un 68 %, en nodos como la isocitrato deshidrogenasa y la  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa, en la condición denominada de baja disponibilidad de oxígeno con respecto a la condición de alta disponibilidad de oxígeno. En la condición de baja disponibilidad de oxígeno los flujos de carbono relacionados con las vías de generación del acetyl-CoA y sus precursores, el piruvato (PYR) y el fosfoenolpiruvato (PEP) se incrementaron entre 17 y 44 % con respecto a las condiciones de alta disponibilidad de oxígeno. De forma relevante, se observó un impacto significativo en el flujo metabólico, en el ciclo del glioxilato, en el cual se incrementó el flujo relativo hasta 2.8 veces en condiciones de baja disponibilidad de oxígeno. Cabe resaltar que estas tres vías participan en el metabolismo del acetyl-CoA, donador de grupos acetilo para la acetilación del alginato y la biosíntesis de P3HB, lo cual se reflejó en un incremento en el grado

de acetilación del alginato (2.6 veces) y en la producción de P3HB, la cual solo se observó en la condición de baja disponibilidad de oxígeno.

En la segunda etapa del estudio, en cultivos en quimiostato limitados por glucosa, con un control estricto de las variables de cultivo se estudió el efecto independiente de la TOD (1, 5 y 9 %) y la  $\mu$  (0.02 - 0.15 h<sup>-1</sup>) sobre la acetilación del alginato. Con esta estrategia fue posible identificar el efecto de la TOD y la  $\mu$  sobre la acetilación de los alginatos producidos por *A. vinelandii*. En lo que se refiere al efecto de la TOD, Se demostró que el grado de acetilación del alginato fue mayor en condiciones de alta TOD (9 %); en contraste, se observó que el grado de acetilación disminuye al incrementarse la  $\mu$ , independientemente de la TOD. Por lo que, en este estudio el valor más alto del grado de acetilación del alginato (6.88 %) se obtuvo en condiciones de alta TOD (9 %) y baja  $\mu$  (0.04 h<sup>-1</sup>). Bajo estas condiciones de cultivo se observaron dos respuestas fisiológicas importantes que afectan positivamente el grado de acetilación del alginato: a) el incremento en la TOD impactó negativamente la producción de P3HB, por lo cual en los cultivos a 9 % de TOD el contenido de P3HB fue despreciable independientemente de la  $\mu$ ; y b) la disminución en la  $\mu$  (a 0.04 h<sup>-1</sup>) se reflejó en una disminución en la velocidad específica de consumo de oxígeno hasta en un 46 %, con respecto a los cultivos desarrollados a 9 % de TOD y  $\mu$  de 0.15 h<sup>-1</sup>. Estas dos respuestas, la síntesis de P3HB y la velocidad de consumo de oxígeno, están estrechamente relacionadas con el metabolismo del acetil-CoA (donador de grupos acetilo para la acetilación del alginato). Lo anterior indica que a 9 % de TOD y  $\mu = 0.04$  h<sup>-1</sup>, al disminuir la síntesis de P3HB y el consumo específico de oxígeno, se incrementa la disponibilidad de acetil-CoA para el proceso de acetilación del alginato. Adicionalmente, bajo estas condiciones de cultivo (9 % de TOD y  $\mu = 0.04$  h<sup>-1</sup>) se favoreció la síntesis de alginato, reflejándose en rendimientos elevados de alginato con base a biomasa (3.4 g<sub>Alg</sub> g<sup>-1</sup>), sugiriendo una estrecha relación entre el proceso de acetilación y la canalización del carbono hacia la biosíntesis del alginato.

---

## ABSTRACT

Bacterial alginates are exopolysaccharides conformed by  $\alpha$ -D-mannuronic and  $\beta$ -L-guluronic acids, and may present O-acetylation at O-2 and O-3 positions of the mannuronic acid. Alginates are important due their capability as viscosifier and gel-forming agents. It has been demonstrated that O-acetylation increases the viscosity of alginate solutions and the gel swelling capability.

*Azotobacter vinelandii* cultures are one alternative to obtain alginates with a defined composition. *A. vinelandii* is a soil bacterium, which produce alginate and poly-(3- hydroxybutyrate) (P3HB), an intracellular polymer. The chemical composition of alginates synthesized by *A. vinelandii* depends on culture conditions. In previous studies in shaken flasks cultures described that degree of acetylation of alginates increased under low aeration conditions with respect to the cultures under high aeration conditions; however, under those culture conditions it was not possible to define if changes in the acetylation degree were the result of oxygen availability and/or the changes on the specific growth rate ( $\mu$ ).

The main objective of the present study was to understand the effect of dissolved oxygen tension (DOT) and/or specific growth rate ( $\mu$ ) on the degree of acetylation of alginates produced by *A. vinelandii* ATCC9046.

The experimental strategy was divided in two stages: during the first approach, acetylation degree of alginates was evaluated in shaken flasks cultures under two different oxygen availability conditions, in addition at this stage the carbon flux was evaluated using [ $^{13}\text{C}_1$ ]-Glucose. On the second stage the acetylation degree of alginates was evaluated in chemostat cultivations at different DOT (1, 5 and 9 %) and  $\mu$  (0.02 - 0.15  $\text{h}^{-1}$ ).

Under conditions without control of DOT and  $\mu$  (shaken flasks cultures), it was demonstrated that oxygen availability has an important effect on the carbon fluxes. The main differences at flux level were found at the tricarboxylic acid (TCA) cycle; in this pathway there was a reduction of up to 68 % under low aeration condition, at nodes such as isocitrate dehydrogenase and  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenas, in contrast to the fluxes observed under the high aeration condition. Secondly, under the low aeration condition the relative metabolic fluxes involved in the acetyl-CoA, pyruvate (PYR) and phosphoenolpyruvate (PEP) generation were higher (17 and 44 %) than those observed under the high aeration condition. Finally, the third pathway affected by changes in the oxygen availability was the glyoxylate shunt, the metabolic fluxes through this pathway increased up to 2.8 times fold under the low aeration condition as compared to the cultures developed under high aeration. It must be emphasized that these pathways are involved on the acetyl-CoA metabolism, donor of acetyl groups for alginate acetylation and P3HB production, and it was reflected on the acetylation degree of alginate that increased up to 2.6

times fold under the low aeration condition as well as on the P3HB production. However, at this stage it was not possible to differentiate between the effect of DOT and  $\mu$ .

On the second stage of this study, using chemostat cultures with a strict control of the DOT and  $\mu$  we were able to evaluate the role of these parameters on the degree of acetylation of alginates. It was found that alginate acetylation increased on the cultures developed at high values of DOT (9 %); on the other hand, the acetylation degree of alginates were higher in those cultivations carried out at low values of  $\mu$  independently of the DOT value. The highest value of the acetylation degree of alginates (6.88 %) was reached at 9 % of DOT and  $\mu = 0.04 \text{ h}^{-1}$ , under these conditions three important physiological responses, related with the increased of alginate acetylation, were found: at these conditions P3HB production was negligible due to the high DOT, besides there was a reduction (46 %) of the specific oxygen consumption rate as a response of the low value of  $\mu$  ( $0.04 \text{ h}^{-1}$ ). These responses are related with acetyl-CoA metabolism, suggesting that at these culture conditions acetyl-CoA availability for alginate acetylation increased. Finally, under these growth conditions alginate biosynthesis was favored reaching high values of alginate yields based on biomass ( $3.4 \text{ g}_{\text{Alg}} \text{ g}^{-1}$ ), suggesting a correlation between alginate acetylation process and alginate biosynthesis.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los alginatos son polisacáridos lineales conformados por los ácidos  $\beta$ -D manurónico (M) y su epímero en el carbono C-5 el ácido  $\alpha$ -L gulurónico (G) unidos por enlaces glicosídicos 1-4 (Tielen et al., 2005). Los residuos M y G se distribuyen en bloques heteropoliméricos (MGMG) o bien en bloques homopoliméricos (MMMM o GGGG) (Draget y Taylor, 2011). Los alginatos se producen por algas marinas de la clase *Phaeophyceae* y por bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Azotobacter* (Draget y Taylor, 2011). En el caso de los alginatos de origen bacteriano estos pueden presentar O-acetilación en las posiciones C-2 y C-3 de los residuos de ácido manurónico (Franklin et al., 2011).

Los alginatos se caracterizan por sus propiedades como agentes viscosificantes y gelificantes, por lo que son empleados en diversas industrias entre las que se encuentran la de alimentos, textil, cosmética y farmacéutica (Hay et al., 2010). En años recientes, estos polímeros, han adquirido importancia en la medicina y la biomedicina debido a sus usos potenciales para la inmovilización de células o fármacos (Draget y Taylor, 2011; Peña et al., 2011a); así como material de soporte en procesos de trasplante de tejidos (Re'em et al., 2010). Es importante resaltar que la capacidad gelificante y/o viscosificante de los alginatos y por lo tanto, los usos potenciales de estos polímeros dependen principalmente de su composición química: peso molecular promedio (PMP), el índice de polidispersión, la relación del contenido de ácido gulurónico y manurónico (G/M), así como el grado de acetilación. Específicamente, en el caso de la acetilación de los alginatos se ha demostrado que la presencia de grupos acetilo incrementa la viscosidad de las soluciones de alginato, independientemente del PMP del polímero (Peña et al., 2006; Tielen et al., 2005). En el caso de la gelificación, se ha observado que la presencia de grupos acetilo incrementa la interacción alginato-solvente (Windhues y Borchard, 2003) aumentando la turgencia de los geles de alginato acetilado (Skaej-Braek, 1989).

El empleo de cultivos bacterianos para la producción de alginato permiten que la composición química del polímero se pueda manipular mediante las condiciones de cultivo (Galindo et al., 2007; Hay et al., 2010; Peña et al., 2011a). En el caso de los alginatos producidos por *Azotobacter vinelandii*, diversos autores han reportado el efecto de la composición del medio de cultivo, la disponibilidad de oxígeno y la velocidad específica de crecimiento sobre la producción y composición química del alginato, principalmente en lo que se refiere al PMP y la relación G/M de la molécula (Peña et al., 1997; 2000, Sabra et al., 1999; 2000; Trujillo-Roldán, 2004; Díaz-

Barrera, 2010; 2012). En cuanto al posible efecto de las condiciones de cultivo sobre la acetilación de los alginatos sintetizados por *A. vinelandii*, se ha reportado que puede ser afectada por la composición del medio de cultivo, como es la adición de amortiguadores de pH como el ácido 3-(morfolino) propanosulfónico (MOPS) (Peña et al., 2006); así como la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{PO}_4$  (Annison y Couperwhite, 1986). Además, se ha descrito que los cambios en la disponibilidad de oxígeno (Cárdenas, 1997; Peña et al., 2011b) y la velocidad específica de crecimiento (Annison y Couperwhite, 1986), también afectan la acetilación de los alginatos.

Además de la producción de alginato, *A. vinelandii* se caracteriza por su capacidad de producir poli-(3-hidroxi-butirato) (P3HB), el cual es un poliéster de la familia de los polihidroxicanoatos (PHAs). Este polímero ha adquirido importancia comercial, como sustituto de los plásticos derivados del petróleo, debido a que es un polímero biodegradable con propiedades mecánicas similares a las del polipropileno (Galindo et al., 2007; Peña et al., 2011a). La biosíntesis de P3HB en *A. vinelandii* se favorece principalmente en condiciones de limitación de oxígeno (Peña et al., 2011a) y durante la fase estacionaria (Hernández-Eligio et al., 2011).

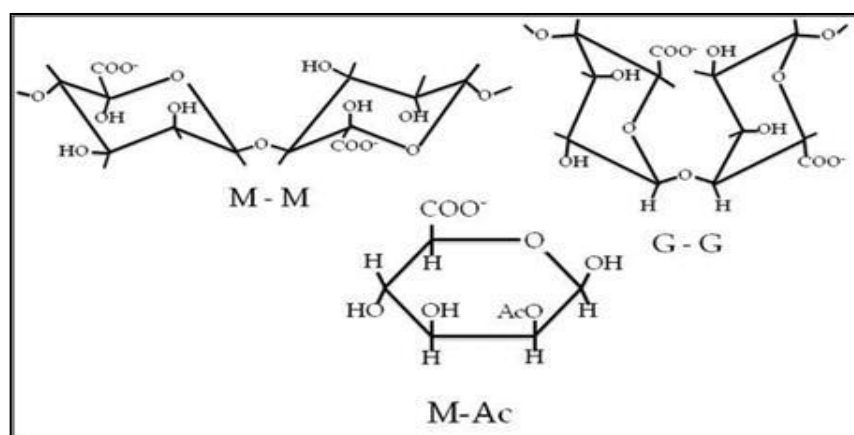
En el caso de la acetilación de los alginatos se ha propuesto que el acetil-CoA es el principal donador de grupos acetilo (Clarke et al., 2000), y este cofactor es también el precursor de la biosíntesis de P3HB (Galindo et al., 2007). Por lo que diversos autores han propuesto que el incremento en la producción de P3HB, así como en el grado de acetilación del alginato observado en condiciones de limitación de oxígeno podría estar relacionado con un incremento en la disponibilidad de acetil-CoA.

Con base en lo anterior, en el presente estudio se evaluó el efecto de la TOD y la velocidad específica de crecimiento sobre el grado de acetilación del alginato producido por *A. vinelandii*. Con la finalidad, de identificar las condiciones de cultivo que afectan el grado de acetilación de los alginatos, y de esta manera, en un futuro poder diseñar estrategias de producción y de ingeniería de rutas metabólicas para la obtención de alginatos con grados de acetilación definidos.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Estructura, propiedades y aplicaciones de los alginatos

El alginato es un polímero con carga aniónica, de estructura lineal conformado por el  $\beta$ -D- ácido manurónico (M) y su epímero, en el C-5, el ácido  $\alpha$ -L- gulurónico (G) unidos por enlaces 1, 4 glicosídicos (Augst et al., 2006). En el caso de los alginatos obtenidos a partir de fuentes bacterianas estos pueden presentar O-acetilación en las posiciones C-2 y/o C-3 de los residuos de ácido manurónico (Tielen et al., 2005; Franklin et al., 2011; Fig.2.1). La distribución de los monómeros puede presentarse en bloques homopoliméricos (MMMM o GGGG) o bien en bloques heteropoliméricos (MGMGMG).



**Figura 2.1.** Estructura química característica de los alginatos bacterianos (Peña et al., 2011a).

Las soluciones de alginato presentan características reológicas no-Newtonianas de tipo pseudoplásticas (Clementi, 1997). La capacidad viscosificante de estas soluciones depende de la concentración del polímero, de la relación G/M, del peso molecular promedio (PMP) y su polidispersión, así como del porcentaje de grupos acetilo presentes en las moléculas de alginato (Clementi, 1997; Peña et al., 2006). Observándose un incremento en la viscosidad de las soluciones de alginato, principalmente, al incrementarse el PMP y/o la presencia de grupos acetilo (Galindo et al., 2007; Peña et al., 2006; Tielen et al., 2005).

Otra característica importante de los alginatos es su capacidad de formar geles, este proceso se presenta principalmente por la interacción de los grupos carboxilo de los monómeros del ácido gulurónico con cationes divalentes ( $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Ba}^{2+}$ ). La rigidez y la capacidad de hidratación de los geles depende principalmente de la relación G/M, así como del porcentaje de grupos acetilo en el polímero (Hay et al., 2010); de esta forma, la rigidez de los geles se incrementa conforme la

proporción de bloques G es mayor y disminuye en los alginatos acetilados. En contraste, la presencia de los grupos acetilo incrementan la interacción de las moléculas del polímero con el solvente, incrementando la turgencia en los geles de alginato acetilado (Skaej-Braek, 1989; Windhues y Borchard, 2003).

Por sus características reológicas, los alginatos han sido empleados, en diversas industrias como agentes viscosificantes, emulsificantes y estabilizantes, principalmente en las industrias de alimentos, farmacéutica, cosmética y textil (Tabla 2.1).

**Tabla 2.1.** Aplicaciones de los alginatos

<b>Industria</b>	<b>Característica</b>	<b>Aplicaciones específicas</b>	<b>Referencia</b>
<i>Alimentos</i>	Estabilizador	Estabilizador de espuma en la industria cervecera	Gacesa, 1988; Rehm y Valla, 1997
	Viscosificante	Espesante de salsas, jugos, mermeladas, lácteos, etc.	Gacesa, 1988; Rehm y Valla, 1997
	Gelificante	Reconstituyente de alimentos	Gacesa, 1988
<i>Farmacéutica / cosmética</i>	Viscosificante	Emulsionante en preparaciones cosméticas y farmacéuticas	Gacesa, 1988; Rehm y Valla, 1997
	Gelificante	Preparación de moldes dentales	Gacesa, 1988; Rehm y Valla, 1997
	Fibras/Películas	Recubrimiento de tabletas; material para el recubrimiento de heridas	Gacesa, 1988; Rehm y Valla, 1997
<i>Biomédica</i>	Gelificante	Micro y nano encapsulación de fármacos o proteínas.	Augst et al., 2006; Hamidi et al., 2008; Peña et al., 2011a; Hay et al., 2013
	Gelificante	Soporte de células y tejidos en procesos de trasplantes	Re'em et al., 2010; Hay et al., 2013
<i>Ambiental</i>	Gelificante	Inmovilización de microorganismos para el tratamiento de aguas residuales	Covarrubias et al., 2012
<i>Textil</i>	Viscosificante / estabilizador	Impresión de pinturas	Gacesa, 1988; Rehm y Valla, 1997

En años recientes, estos polímeros han adquirido importancia debido a que son compuestos no tóxicos, hidrofílicos, biocompatibles, que no generan respuesta inmune (Peña et al., 2011a). Por lo que, se han propuesto por su capacidad gelificante como un sistema de micro y nano encapsulación para la liberación controlada de fármacos y/o proteínas en tratamiento de enfermedades como tuberculosis, cáncer y diabetes (Augst et al., 2006; Hamidi et al., 2008), o como soporte de células durante los procesos de trasplante de tejidos (Re'em et al., 2010).



Los alginatos se producen en algas marinas de la clase *Phaeophyceae* y en bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Azotobacter*. Sin embargo, la función de los alginatos difiere de forma importante en cada uno de estos organismos. En las algas marinas el alginato es un componente estructural de la pared celular de estos organismos proporcionando soporte y flexibilidad (Draget y Taylor, 2011).

En contraste, los alginatos bacterianos se secretan al medio. En el caso de la especie patógena oportunista *P. aeruginosa*, el alginato se ha descrito como un factor de virulencia importante durante los procesos de infección en los pacientes con fibrosis quística, siendo un componente fundamental de estructuras tridimensionales denominadas biopelículas. Por otra parte, en *A. vinelandii* el alginato forma parte estructural del recubrimiento de los quistes, estructuras resistentes a la desecación; no obstante, en condiciones de crecimiento vegetativo también tiene lugar la producción de alginato (Remminghorst y Rehm, 2006a). Bajo estas condiciones de crecimiento se ha propuesto que el alginato podría formar una barrera que protege a las células de la exposición a elevadas concentraciones de oxígeno (Sabra et al., 2000) y/o metales pesados (Clementi, 1997).

El proceso más empleado para la producción de alginatos, por su bajo costo y rentabilidad es la extracción a partir de algas de las especies *Macrocystis pyrifera*, *Ascospheyrillum* y *Laminaria hyperborea* (Augst et al., 2006; Hay et al., 2010); sin embargo, mediante este sistema de producción no es posible manipular y controlar la composición química de los alginatos debido a que esta es dependiente de las condiciones ambientales en los ecosistemas marinos en donde se producen y cosechan este tipo de algas (Galindo et al., 2007).

En contraste, el empleo de cultivos bacterianos, como *A. vinelandii*, permite la manipulación de la composición química de los alginatos mediante el control de las condiciones de cultivo, con la ventaja adicional de que los alginatos producidos en cultivos bacterianos pueden presentar, como se ha descrito previamente, O-acetilación en los C-2 y/o C-3 de los residuos de ácido manurónico (Galindo et al., 2007).

## **2.2 *Azotobacter vinelandii* como modelo de producción de alginato**

### **2.2.1 Generalidades de *A. vinelandii***

*A. vinelandii* es una bacteria de vida libre, no patógena, Gram negativa de la clase de las gamma-proteobacterias, que habita principalmente en suelos. *A. vinelandii* presenta características metabólicas relevantes, entre las que se encuentra la capacidad de fijar

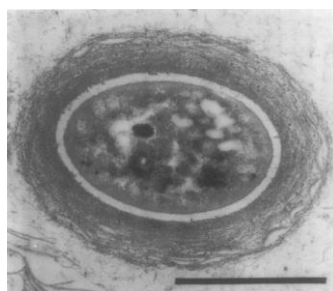
nitrógeno. La fijación de nitrógeno es un proceso mediante el cual el nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) es convertido en amonio ( $NH_3$ ) (Curatti et al., 2005). Para la fijación de nitrógeno, *A. vinelandii* posee tres clases de nitrogenasas, las cuales se clasifican dependiendo del tipo de cofactores metálicos que contienen, los cuales pueden ser: Molibdeno - Hierro (Mo-Fe), Vanadio (Va) y/o Hierro (Fe). La expresión de estas enzimas es dependiente de la disponibilidad de los iones metálicos en el medio de cultivo (Setubal et al., 2009).

El proceso de fijación de nitrógeno es dependiente de una elevada cantidad de energía en forma de ATP (se requieren 16 moléculas de ATP por cada molécula de  $N_2$ ) y equivalentes reductores (8 moléculas de NADH por cada molécula de  $N_2$ ) (Igarashi et al., 2004). Cabe mencionar, que las nitrogenasas son metaloproteínas sensibles al oxígeno, lo cual podría ser contradictorio con otra característica relevante de *A. vinelandii*, debido a que es una bacteria estrictamente aerobia. La capacidad de *A. vinelandii*, de fijar nitrógeno en condiciones de aerobiosis ha sido ampliamente estudiada y se han reportado diversos mecanismos fisiológicos que permiten la protección de los sistemas nitrogenasa cuando *A. vinelandii* es expuesta a elevadas concentraciones de oxígeno (Poole y Hill, 1997; Oelze, 2000; Bertsova et al., 2001; Setubal et al., 2009).

Entre los mecanismos de protección de los sistemas nitrogenasa descritos en *A. vinelandii* se encuentran, la protección conformacional o inactivación reversible así como la protección respiratoria. Esta última consiste en el incremento del consumo de oxígeno conforme aumenta la concentración de oxígeno disuelto en los cultivos de *A. vinelandii*, para lo cual emplea una cadena respiratoria desacoplada conformada por la citocromo oxidasa bd ( $cyt_{bd}$ ) que permite mantener concentraciones bajas de  $O_2$  en el espacio citoplásmico (Poole y Hill, 1997; Oelze, 2000; Bertsova et al., 2001; Setubal et al., 2009).

Otra característica fisiológica importante de *A. vinelandii*, es que en condiciones de limitación nutricional, principalmente ausencia de fuente de carbono, *A. vinelandii* puede diferenciarse en quistes (Fig. 2.2) los cuales se caracterizan por ser estructuras resistentes a la desecación así como a factores de estrés ambiental ya sea químicos y/o físicos (Setubal et al., 2009; Romero et al., 2013). La estructura de un quiste maduro consiste en un cuerpo central, conformado por un núcleo protoplásmico central, la membrana citoplasmática y una delgada pared celular de ácido murámico. En el cuerpo central, durante el proceso de enquistamiento se presenta una mayor acumulación de lípidos entre los que se encuentran el poli-(3-hidroxi-butarato) (P3HB), el cual es

un poliéster de la familia de los polihidroxicanoatos que en *A. vinelandii* se acumula como material de reserva de carbono y energía.



**Figura 2.2.** Microfotografía de un quiste maduro de *A. vinelandii* (Sadoff, 1975)

El cuerpo central está rodeado por una cubierta interna denominada intina y una envoltura externa conformada por varias capas de lipoproteínas y lipopolisacáridos conocida como exina. Ambas estructuras, intina y exina, se caracterizan por su elevado contenido de alginato, el cual representa alrededor del 72 % de los carbohidratos presentes en la intina y el 40 % de los carbohidratos presentes en la exina (Sadoff, 1975). Es importante señalar que la composición química de los alginatos difiere entre ambas estructuras principalmente en lo que se refiere a la relación G/M (Tabla 2.2), observándose que en la fracción correspondiente a la intina el contenido de ácido manurónico es mayor con respecto al contenido de ácido gulurónico. En contraste, en la fracción de exina el contenido de ácido gulurónico es mayor, lo que incrementa la rigidez y resistencia mecánica de esta estructura (Sadoff, 1975). Otra característica importante de los alginatos presentes en los quistes, es que estos son acetilados y se ha observado en cepas mutantes *algF* (-), que producen alginatos no acetilados, que la eficiencia de enquistamiento, así como la viabilidad de los quistes se veía disminuida considerablemente con respecto a la cepa silvestre (Vázquez et al., 1999).

**Tabla 2.2.** Composición de los alginatos en quistes de *A. vinelandii* (Sadoff, 1975)

Fracción	Relación M/G	Contenido de ácidos urónicos (%)		
		MG	MM	GG
Cápsula de la célula (etapa vegetativa)	1.8	62.6	33.5	3.9
Exina	0.5	52.8	4.6	42.6
Intina	1.8	51.3	38.8	9.1

Sin embargo, es importante resaltar que la producción de alginato y P3HB en *A. vinelandii*, no sólo se presenta durante el proceso de enquistamiento, sino que también se observa durante el

crecimiento vegetativo, lo cual representa otra característica relevante de este organismo, como una fuente potencial para la producción de estos polímeros de interés industrial y comercial.

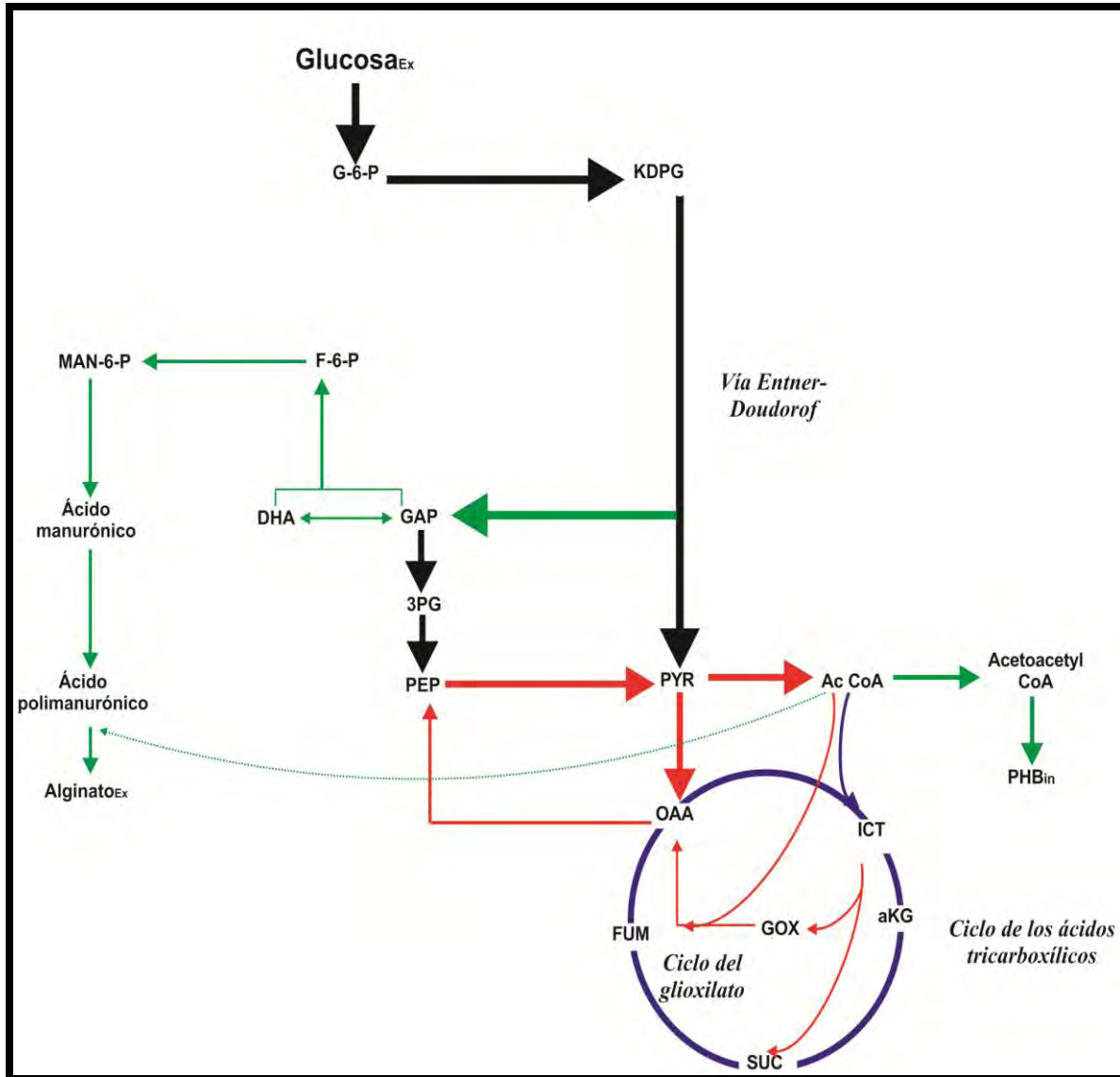


Figura 2.3. Rutas metabólicas en *A. vinelandii* (Base de datos Kyoto encyclopedia of genes and genomes KEGG)

### 2.2.2 Metabolismo de *A. vinelandii*

La vía Entner-Doudoroff (ED) es la principal vía metabólica para la asimilación de glucosa en *A. vinelandii* (Fig. 2.3) (Still y Wang, 1964; Lynn y Sokatch, 1984; Beale y Foster, 1996), esta vía se caracteriza por ser una vía de bajo rendimiento energético común en bacterias Gram negativas. Adicionalmente, *A. vinelandii* también cuenta con las enzimas necesarias para emplear la vía de las pentosas fosfato (PP) (Base de datos KEEG, 2010; Still y Wang, 1964). En *A. vinelandii*, la

glucosa se internaliza a través de la glucosa permeasa Glu-1 (Wong et al., 1995). En el interior de la célula, la glucosa es fosforilada en el C-6 por la glucosa cinasa para dar lugar a la glucosa-6-P (G-6-P). Posteriormente la G-6-P es transformada en 6-fosfogluconato por las enzimas glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y 6-fosfogluconolactonasa (Daddaoua et al., 2009). El 6-fosfogluconato es el precursor inicial de la vía E-D, en donde es transformado en 2 -ceto-3-deoxifosfogluconato (KDPG por sus siglas en ingles), el cual es hidrolizado por la enzima 2-ceto-3- deoxi-6-fosfogluconato aldolasa en gliceraldehído-3-P (GAP) y piruvato (PYR) (Beale y Foster, 1996).

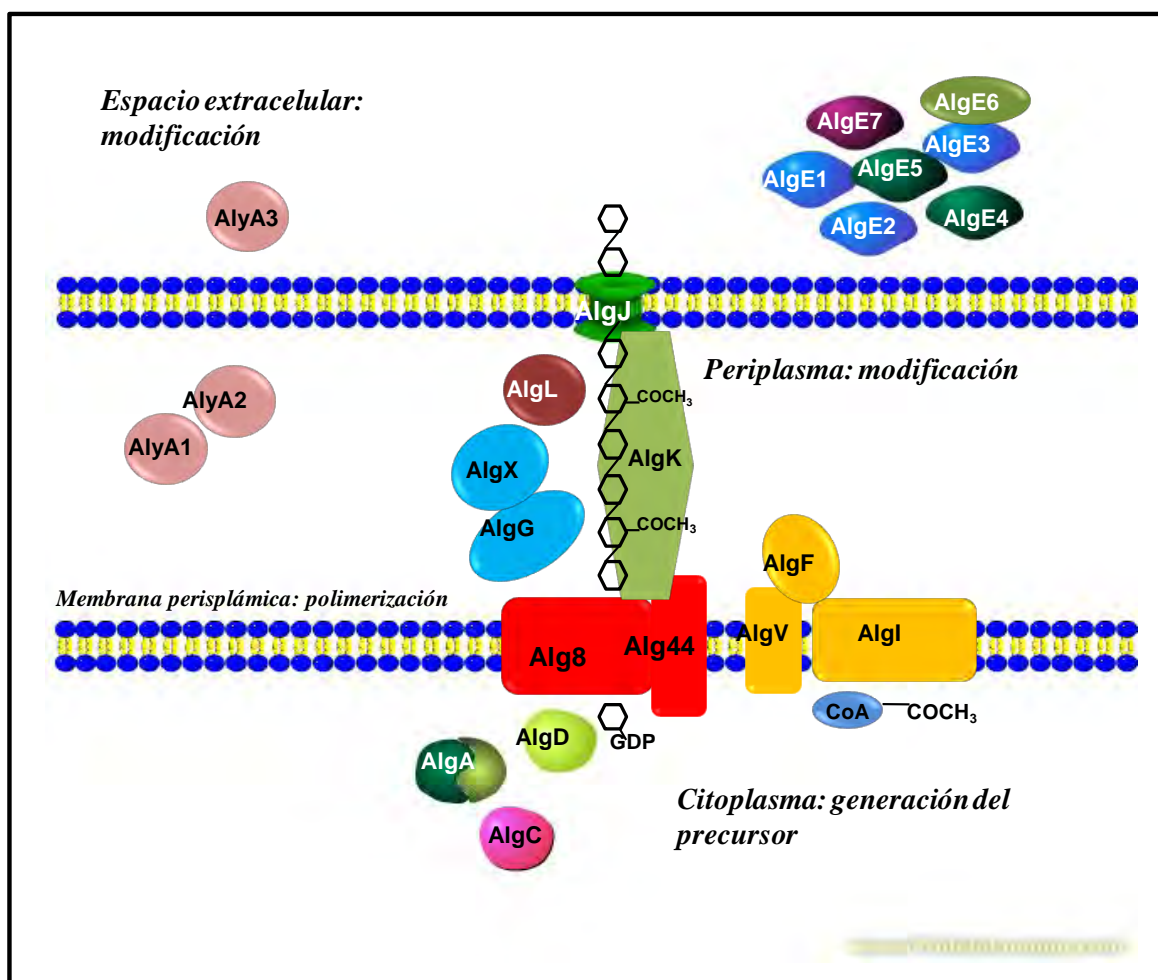
El PYR es transformado en acetil-Coenzima A (acetil-CoA) por la enzima piruvato deshidrogenasa; posteriormente el acetil-CoA es desviado a tres destinos principalmente (Fig. 2.3): la generación de energía al incorporarse al ciclo de los ácidos tricarbóxicos, principal vía de generación de NADH y NADPH; la producción de P3HB y adicionalmente, se ha propuesto que el acetil-CoA es el donador de grupos acetilo para la acetilación del alginato (Vázquez et al, 1999; Franklin y Ohman, 2002).

La otra triosa resultante de la vía ED, el GAP, se condensa con una molécula de dihidroxiacetona (DHA) para dar lugar a la fructosa-6-P (F-6-P), principal precursor de la biosíntesis de alginato.

### **2.2.3 Biosíntesis del alginato en *A. vinelandii***

La ruta de biosíntesis de alginato en *A. vinelandii* y *P. aeruginosa*, puede dividirse en tres etapas (Fig. 2.4) (Galindo et al., 2007; Franklin et al., 2011): la formación del precursor el ácido GDP-manurónico, la polimerización y finalmente, la modificación y transporte del polímero.

La biosíntesis del alginato inicia en el citoplasma (Fig. 2.4) en donde tiene lugar la formación del precursor, el ácido GDP-manurónico, a partir de la F-6-P. En esta etapa participan tres enzimas, la enzima bifuncional fosfomanosa isomerasa / GDP-manosa pirofosforilasa (AlgA), la fosfomanosa mutasa (AlgC) y finalmente la GDP-manosa pirofosforilasa (AlgD). La primera etapa es la isomerización de la F-6-P en manosa-6-P (M-6-P) por la enzima bifuncional AlgA. Posteriormente, la enzima AlgC transfiere el grupo fosfato de la M-6-P al C-1 dando como resultado manosa-1-P (M-1-P). La siguiente etapa, es la activación por la enzima AlgA, de la M-1-P en GDP-manosa por la incorporación del grupo GDP; y finalmente la oxidación de la GDP-manosa en ácido GDP-manurónico por la enzima AlgD, esta reacción libera dos moléculas de NADH.



**Figura 2.4.** Modelo de la biosíntesis de alginato en *A. vinelandii*: ubicación espacial y proteínas participantes. Elaborado en el ambiente [www. ProteinLounge.com](http://www.ProteinLounge.com).

La siguiente etapa de la síntesis del alginato es la polimerización del ácido polimanurónico. Esta etapa tiene lugar en la membrana periplásmica (Fig. 2.4), y en ésta participan las enzimas Alg8 y Alg44, las cuales se ha demostrado en *A. vinelandii* (Mejía-Ruíz et al., 1997) y *P. aeruginosa* (Franklin et al., 2011) son esenciales para la producción de alginato y que cepas mutantes *alg8* (-) y *alg44* (-) no producen alginato.

La proteína Alg8 en *P. aeruginosa* tiene cuatro dominios transmembranales (TM) y una región glicosiltransferasa citoplásmica (GT) (Franklin et al., 2011). Esta proteína se ha clasificado dentro de la familia de las  $\beta$  - glicosiltransferasas Clase II. Remminghorst y Rehm (2006b) observaron en *P. aeruginosa* que en cepas mutantes la sobreexpresión del gen *alg8*, incrementaba la producción de alginato hasta 20 veces con respecto a la producción de la cepa nativa. En estas cepas mutantes además se observó un incremento en el grado de acetilación y una disminución en la relación G/M (Remminghorst y Rehm, 2006b).



La proteína Alg44, tiene un dominio TM y una región citoplásmica con un dominio PilZ, afín al segundo mensajero c-di-GMP, el cual se ha observado es necesario para la polimerización del alginato, aún cuando se desconocen los mecanismos moleculares que regulan este proceso (Franklin et al., 2011). Adicionalmente, se ha propuesto que el extremo carboxilo terminal forma parte de un complejo proteico que sirve de andamiaje durante el transporte del alginato a través del periplasma.

La tercera etapa de la biosíntesis de alginato consiste en la modificación y transporte del ácido polimanurónico a través del periplasma hacia el exterior de la célula. En esta etapa se lleva a cabo la O-acetilación de algunos residuos de ácido manurónico, proceso en el que participan tres proteínas esenciales para la acetilación, las cuales se ha propuesto forman un complejo en donde se lleva a cabo el proceso de acetilación. Los genes que codifican para este complejo se han descrito en *A. vinelandii* (Vázquez et al., 1999) y *P. aeruginosa* (Franklin y Ohman 2002; Franklin et al., 2004); en *P. aeruginosa* se ha descrito la localización y función de cada una de estas proteínas.

El complejo acetil-transferasa está compuesto por las proteínas AlgI/AlgV/AlgF. La primera proteína del complejo es AlgI, la cual en *P. aeruginosa* se ha demostrado tiene siete dominios TM. En *P. aeruginosa*, se ha propuesto que esta proteína, homóloga a las proteínas acil-acarreadoras es la responsable de transportar los grupos acetilo del citoplasma hacia el periplasma, donde se lleva a cabo la acetilación (Franklin et al., 2004). Las otras dos proteínas del complejo acetil-transferasa son AlgV (AlgJ en *P. aeruginosa*), la cual se ha descrito como una proteína periplásmica anclada a la membrana citoplásmica y finalmente AlgF que es una proteína periplásmica (Franklin et al., 2004). Aún cuando se desconocen los mecanismos moleculares que ocurren durante la acetilación del alginato, se ha propuesto que este complejo actúa al nivel del polímero (el ácido polimanurónico) y que podría interactuar con las proteínas de transporte y polimerización. La acetilación de los alginatos se ha propuesto como una etapa en la edición del alginato que protege al polímero de las actividades alginato liasa y epimerasa.

Además de la acetilación, el alginato es susceptible a otros procesos de edición por las enzimas alginato liasas y epimerasas. Cabe destacar que es en estos procesos en los que se han reportado mayores diferencias entre *A. vinelandii* y *P. aeruginosa*. En lo referente a las alginato liasas, en las dos especies se ha reportado actividad alginato liasa periplásmica. En el caso de *P. aeruginosa* esta actividad se debe únicamente a la proteína AlgL, la cual se ha sugerido forma parte del andamiaje periplásmico que transporta y protege al alginato en el periplasma.

En contraste, en *A. vinelandii* además de AlgL se han identificado las proteínas AlyA1 y AlyA2 en periplasma (Gimmestad et al., 2009), y en el espacio extracelular se han descrito dos proteínas con actividad alginato liasa, la proteína AlyA3 (Gimmestad et al., 2009) y la epimerasa AlgE7 (Svanem et al., 2001).

En el caso de las enzimas con actividad epimerasa sobre el C-5 de los residuos manurónicos en *P. aeruginosa* únicamente se ha reportado la epimerasa periplásmica AlgG, que además de la actividad epimerasa forma parte del complejo proteico de transporte del alginato en el espacio periplásmico. En *A. vinelandii*, además de la proteína AlgG se han reportado siete enzimas con actividad epimerasa presentes en el espacio extracelular denominadas AlgE1 - AlgE7 (Skæj-Braek y Larsen, 1985; Svanem et al., 2001; Galindo et al., 2007).

Se ha propuesto que en el proceso de transporte del alginato a través del periplasma participan las proteínas AlgX y AlgK, las cuales podrían facilitar el transporte del alginato y protegerlo de la degradación (Hay et al., 2012). Específicamente AlgK es una lipoproteína asociada a la membrana externa y existe evidencia que sugiere que AlgK podría relacionarse con la localización de la proteína responsable de exportar el alginato al espacio extracelular (Alg E en *P. aeruginosa*). Adicionalmente, en *P. aeruginosa* se ha observado que las proteínas AlgX y AlgK podrían formar un complejo con la proteína MucD, la cual se ha demostrado puede actuar como regulador positivo o negativo de la síntesis de alginato (Hay, et al 2012).

Finalmente, el alginato es exportado al espacio extracelular por la proteína AlgJ, (homóloga de la proteína AlgE en *P. aeruginosa*). AlgJ es una proteína de membrana externa, que forma un canal aniónico específico para la exportación del alginato (Rehm, 1996). Recientemente, en *P. aeruginosa* se observó que las proteínas AlgE y AlgK podrían interactuar, al presentar esta última, una fracción lipídica que le permite anclarse a la membrana externa y que podría actuar como sitio de reconocimiento de AlgE (Franklin et al., 2011).

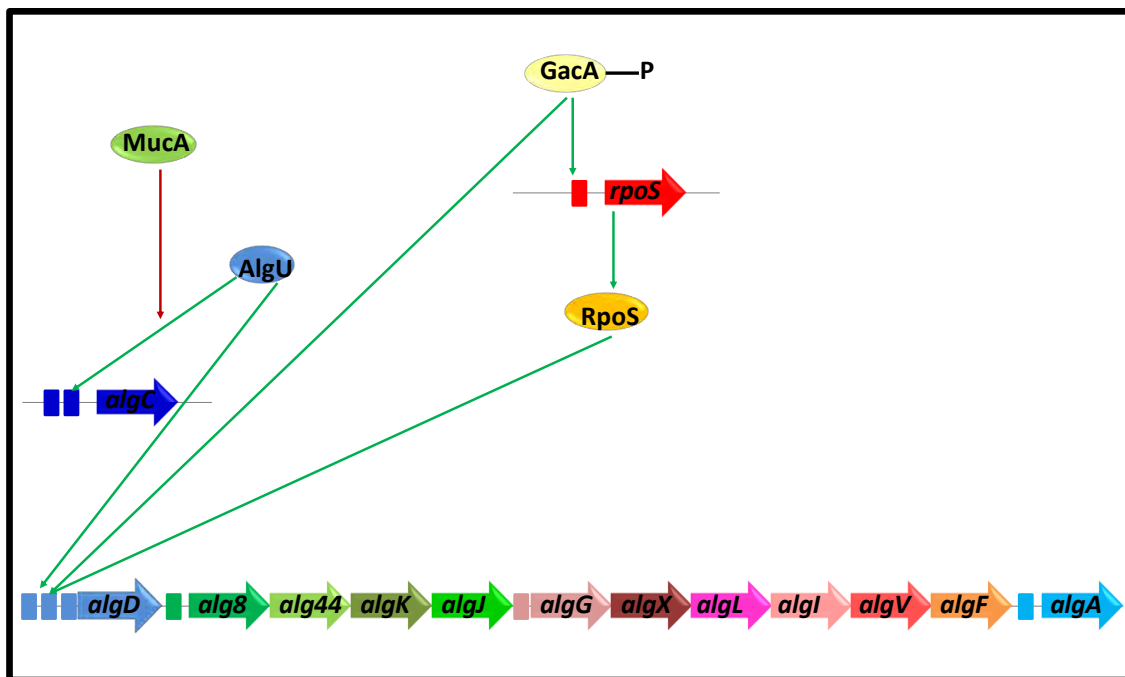
#### **2.2.4 Genes estructurales de la biosíntesis del alginato en *A. vinelandii*: localización y regulación.**

En *A. vinelandii*, los genes estructurales de la biosíntesis de alginato, a excepción de *algC* se localizan en la misma región del genoma (Galindo et al., 2007; Muhammadi y Ahmed, 2007). Hasta el momento se han descrito las siguientes regiones promotoras (Fig. 2.5): tres promotores "río arriba" de *algD* (*algDp1*, *algDp2* y *algDp3*), un promotor "río arriba" de *alg8*, otro promotor localizado "río arriba" de *algG* (Galindo et al., 2007) y uno más "río arriba" de *algA* (Vázquez et



al., 1999). En lo que se refiere a *algC* se han descrito dos regiones promotoras (*algCp1* y *algCp2*). La expresión de los genes de la biosíntesis de alginato es compleja e involucra factores de transcripción globales como AlgU y RpoS (Núñez et al., 2012). El factor transcripcional AlgU ( $\sigma^E$  en *Escherichia coli*), reconoce los promotores *algDp2* y *algCp1*; este es codificado por el gen *algU* el cual se localiza en el "cluster" conformado por *algUmucABCD*. La expresión de *algU* es regulada negativamente por las proteínas MucA y MucB, descritas como factores anti-sigma E (Núñez et al., 2000; Galindo et al., 2007).

Por otra parte, la transcripción de *algD* también es dependiente del sistema de dos componentes GacS-GacA (Castañeda et al., 2001). En donde GacS es una proteína cinasa que fosforila a la proteína GacA, la cual en su forma fosforilada activa la transcripción de *algD* (Castañeda et al., 2000; Galindo et al., 2007). Adicionalmente, el regulador global GacA promueve la expresión del gen *rpoS* que codifica para el regulador global RpoS que a su vez reconoce la región promotora *algDp1* (Castañeda et al., 2000; Galindo et al., 2007).



**Figura 2.5.** Modelo de la regulación de la expresión de los genes estructurales de la biosíntesis de alginato en *A. vinelandii*. Las líneas verdes representan regulación positiva y las líneas rojas regulación negativa. Adaptado de Galindo et al. (2007).

Es importante señalar que tanto AlgU como RpoS, son factores transcripcionales globales que participan durante el proceso de enquistamiento en *A. vinelandii*. Proceso durante el cual, RpoS

también regula la expresión de los genes estructurales de la biosíntesis de otros componentes de los quistes, el P3HB y los alquilresorcinoles (Romero et al., 2013).

### **2.2.5 Biosíntesis de poli-(3-hidroxi-butirato) en *A. vinelandii***

El P3HB es un poliéster conformado por unidades de 3-hidroxi-butirato, que presenta características químicas y fisicoquímicas semejantes al polietileno y al polipropileno. El P3HB se caracteriza por ser un compuesto biodegradable y biocompatible. En los últimos años este polímero ha adquirido importancia comercial e industrial, como sustituto potencial de los plásticos derivados del petróleo (Galindo et al., 2007; Pyla et al., 2009).

El P3HB es empleado por *A. vinelandii* y otras especies bacterianas, como un material de reserva de carbono y energía. En general, la acumulación de este polímero tiene lugar cuando existe un desbalance nutricional; debido a la limitación de oxígeno, fósforo o nitrógeno, en presencia de un exceso de la fuente de carbono. No obstante, en *A. vinelandii* la acumulación de P3HB se observa principalmente en condiciones de limitación de oxígeno (Senior et al., 1972).

La biosíntesis de P3HB inicia con la condensación de dos moléculas de acetil-Co en acetoacetil-CoA por la  $\beta$ -cetotiolasa. El acetoacetil-CoA se reduce en  $\beta$ -hidroxi-butiril-CoA por la acetoacetil-CoA reductasa dependiente de NADPH. El monómero activado, el  $\beta$ -hidroxi-butiril-CoA, posteriormente es polimerizado por la P3HB sintasa (Galindo et al., 2007; Pyla et al., 2009). Se ha propuesto que la biosíntesis de P3HB se regula por la relación de los cofactores NADPH/NADP, así como por la relación acetil-CoA/CoA (Senior et al., 1972).

Los genes estructurales de la biosíntesis de P3HB se localizan en el operón *phbBAC*, conformado por los genes *phbB*, que codifica para acetoacetil-CoA reductasa; *phbA* que codifica la  $\beta$ -cetotiolasa; y finalmente, el *phbC* que codifica la PHB sintasa. En la región "río arriba" de este operón se localiza el gen *phbR*, el cual codifica la proteína PhbR, el cual es un factor transcripcional. La expresión del operón se regula por dos promotores: pB1 y pB2; el primero es reconocido por PhbR y el factor transcripcional global RpoS reconoce al promotor pB2 (Galindo et al., 2007; Pyla et al., 2009).

## **2.3 Factores de cultivo que afectan la producción y composición del alginato producido por *A. vinelandii***

La principal ventaja que presenta la producción de alginato en cultivos de *A. vinelandii*, es el hecho de que es posible la modificación de la composición química del polímero mediante la manipulación de las condiciones de cultivo.

Entre las variables de cultivo que tienen un impacto sobre la composición química del alginato se han descrito: la composición del medio de cultivo, la disponibilidad de oxígeno (tensión de oxígeno disuelto y/o velocidad de transferencia de oxígeno), así como la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) (Annison y Couperwhite, 1986; Díaz-Barrera, 2007, 2010, 2011, 2012; Flores et al., 2013; Lozano et al., 2011; Peña et al., 2000, 2006; Sabra et al., 1999, 2000; Trujillo-Roldán et al., 2004; Tabla 2.3).

Como se observa en la Tabla 2.3, diversos autores han demostrado que estas variables de cultivo afectan tanto los rendimientos de alginato como sus características químicas; y en trabajos más recientes se ha descrito como estas variables de cultivo podrían impactar en la expresión de los genes estructurales de la biosíntesis de alginato (Díaz-Barrera et al., 2012; Paletta y Ohman, 2012; Flores et al., 2013), o bien en la actividad de algunas enzimas como las alginato liasas (Trujillo-Roldán et al., 2004; Flores et al., 2013).

En lo que se refiere al grado de acetilación del alginato producido por *A. vinelandii*, Annison y Couperwhite (1986), demostraron en cultivos en quimiostato que la concentración de calcio, en un amplio intervalo de concentraciones (0.068 - 2.72 mM) tenía un impacto importante en el grado de acetilación de los alginatos. Adicionalmente, estos autores observaron que independientemente de la concentración de calcio, el grado de acetilación del alginato se incrementaba a una mayor tasa de dilución ( $D$ ) de  $0.32 \text{ h}^{-1}$ , obteniendo el grado de acetilación más alto ( $0.35 \text{ mol}_{\text{ace}} \text{ mol}_{\text{Alg}}^{-1}$ ) a una concentración de calcio de 1.5 mM y una  $D = 0.32 \text{ h}^{-1}$  (Annison y Couperwhite, 1986). No obstante, este estudio se realizó sin un control estricto de la TOD, la cual osciló entre 20 y 30 %.

Además del calcio, otro componente del medio de cultivo que se ha reportado tiene un efecto importante en el grado de acetilación de los alginatos es el ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico (MOPS). Peña et al. (2006), observaron que en cultivos en matraces agitados la adición de MOPS en un intervalo de 0 a 14 mM, se reflejaba en un incremento de hasta 2 veces en el grado de acetilación del alginato en los cultivos con una mayor concentración de MOPS con respecto a aquellos que no contenían MOPS, sin que se afectara el PMP del

alginato. Estos autores sugirieron que el MOPS permitía mantener un pH adecuado para la actividad acetil-transferasa en la región periplásmica (Peña et al., 2006).

**Tabla 2.3.** Factores de cultivo que afectan la producción y composición del alginato producido por *A. vinelandii*.

<b>Factor</b>	<b>Variable de cultivo evaluada</b>	<b>Parámetros evaluados</b>	<b>Tipo de cultivo</b>	<b>Principales aportaciones</b>	<b>Referencia</b>
<b>Composición del medio</b>	Ca	$Y_{Alg}$ ; G.A	Quimiostato	La concentración de calcio tiene un efecto importante sobre el G.A.	Annisson y Couperwhite, 1986
	PO <sub>4</sub>	$Y_{Alg}$ ; PMP; G/M	Lote en biorreactor	La limitación de fosfatos favorece la biosíntesis de alginato.	Sabra et al., 1999
	MOPS	$Y_{Alg}$ ; PMP; G.A.	Lote en matraces	El incremento en la concentración de MOPS favorece el G.A.	Peña et al., 2006
	Fuente de nitrógeno	$Y_{Alg}$ ; PMP	Lote en matraces	En condiciones diazotróficas los rendimientos de biomasa y PMP del alginato disminuyen.	Zapata-Vélez y Trujillo Roldán, 2010
	Concentración de la fuente de carbono	$Y_{Alg}$ ; PMP	Quimiostato	La concentración de sacarosa en el flujo de entrada afecta $Y_{Alg}$ y el PMP del alginato.	Díaz-Barrera et al., 2012.
<b>Disponibilidad de oxígeno</b>	TOD/agitación	$Y_{Alg}$ ; PMP	Lote en biorreactor	En cultivos lote la producción de alginato y su PMP se favorecen para valores de TOD entre 1 y 5 %. A baja agitación (300 rpm) el valor de PMP más elevado se obtuvo a 5 % de TOD. A 700 rpm el PMP presentó un valor máximo a 3 % de TOD.	Peña et al., 2000
	TOD	$Y_{Alg}$ ; PMP; actividad alginato liasa	Lote en biorreactor	Se observó una correlación en la disminución del PMP del alginato y un incremento de la actividad alginato liasa extracelular, la cual es dependiente de la TOD.	Trujillo-Roldán et al., 2004
	VTO	$Y_{Alg}$ ; PMP	Lote en biorreactor	La disminución de la VTO incrementa el PMP del alginato.	Díaz-Barrera et al., 2007
	VTO/TOD	$Y_{Alg}$ ; PMP	Lote en biorreactor	La VTO afecta el PMP del alginato independientemente de la TOD.	Lozano et al., 2011
	VTO/potencia volumétrica	$Y_{Alg}$ ; PMP; G.A.	Lote en matraces	El G.A. del alginato y el PMP se incrementan conforme disminuyen la $VTO_{max}$ y la potencia volumétrica.	Peña et al., 2011b
	VTO	$Y_{Alg}$ ; PMP; <i>alg8</i> ; <i>algL</i>	Quimiostato	A bajas VTOs se observó una correlación entre el incremento en el PMP del alginato y la expresión del gen <i>alg8</i> .	Díaz-Barrera et al., 2011, 2012
	TOD	$Y_{Alg}$ ; PMP; <i>alg8</i> / <i>alg44</i> ; <i>algL</i> / <i>algE7</i> / <i>alyA1-A3</i> ; actividad alginato liasa	Lote en biorreactor	A 1% de TOD se observa un incremento en el PMP, correlacionando un incremento en la expresión de los genes <i>alg8</i> / <i>alg44</i> . En contraste, a 5 % de TOD se observó una mayor actividad alginato liasa. No existe una correlación entre la expresión de los genes estructurales de las alginato liasas y el PMP del alginato.	Flores et al., 2013

En dónde: G.A: Grado de acetilación del alginato; PMP: Peso molecular promedio del alginato

**Tabla 2.3.** Factores de cultivo que afectan la producción y composición del alginato producido por *A. vinelandii*. (Continuación)

<i>Factor</i>	<i>Variable de cultivo evaluada</i>	<i>Parámetros evaluados</i>	<i>Tipo de cultivo</i>	<i>Principales aportaciones</i>	<i>Referencia</i>
<i>Velocidad específica de crecimiento</i>	D	$Y_{Alg}$ ; G.A	Quimiostato	A una concentración de calcio 1.5 mM, el G.A. se incrementa al incrementarse la tasa de dilución.	Annison y Couperwhite, 1986
	D	$Y_{Alg}$ ; PMP; G/M	Quimiostato	El PMP más alto se alcanza en cultivos a altas TOD (10 %) y una $D = 0.08h^{-1}$ .	Sabra et al., 2000
	$\mu$	$Y_{Alg}$ ; PMP	Lote con alimentación exponencial	$Y_{Alg}$ y el PMP del alginato se incrementan conforme $\mu$ disminuye hasta $0.03 h^{-1}$ .	Priego-Jiménez et al., 2007
	D	$Y_{Alg}$ ; PMP	Quimiostato	En cultivos en quimiostato limitados por oxígeno, el PMP del alginato es dependiente de D y la concentración de sacarosa en la alimentación. A una concentración de sacarosa de $5 gL^{-1}$ , el PMP se incrementa a bajas D ( $0.05 h^{-1}$ ), en contraste, a $20 gL^{-1}$ el PMP se incrementa al aumentar la D.	Díaz-Barrera et al., 2010

En dónde: G.A: Grado de acetilación del alginato; PMP: Peso molecular promedio del alginato

Recientemente, en cultivos de *P. aeruginosa* Paletta y Ohman (2012) empleando diferentes medios de cultivo, observaron que el incremento en el grado de acetilación del alginato, correlacionaba con el incremento observado en la expresión de los genes *algD*, *algA* y *algI*. De los cuales, *algI* codifica para la proteína AlgI del complejo acetil-transferasa.

En lo que se refiere al efecto de la disponibilidad de oxígeno sobre el grado de acetilación del alginato producido por *A. vinelandii*, Cárdenas (1997) y Peña et al. (2011b), observaron en cultivos en matraces agitados que el grado de acetilación era mayor en sistemas en donde la velocidad de transferencia de oxígeno (VTO) fue baja. Cárdenas (1997), reportó que en cultivos realizados en matraces convencionales, el grado de acetilación fue hasta 2 veces mayor con respecto al que se obtenía en cultivos en matraces bafleados en los se incrementa la VTO. Posteriormente, Peña et al. (2011b), en cultivos bajo diferentes condiciones de agitación (100 y 200 rpm), reportaron que la disminución en la  $VTO_{max}$  de 6 a  $2.6 mmol L^{-1} h^{-1}$ , se reflejaba en un incremento en el grado de acetilación del alginato de 3.5 a 5.8 %.

Es importante mencionar que en condiciones de limitación de oxígeno como las descritas por Cárdenas (1997) y Peña et al. (2011b), no sólo se favorece la acetilación del alginato, también se favorece la síntesis del P3HB. Como se describió previamente el precursor del P3HB es el acetil-CoA (Galindo et al., 2007), el cual también puede participar como donador de grupos

acetilo durante la acetilación del alginato (Franklin y Ohman, 2002); por lo que se ha propuesto que en condiciones de limitación de oxígeno (bajas  $VTO_{max}$ ), el flujo de carbono hacia el ciclo de los ácidos tricarbónicos podría disminuirse incrementando la disponibilidad de acetil-CoA para la biosíntesis de P3HB (Senior et al., 1972) y la acetilación del alginato (Peña et al., 2011b). No obstante, estos estudios se realizaron en cultivos en matraces en donde no es posible controlar variables de cultivo como TOD y  $\mu$ .

Considerando lo anterior, en el presente trabajo se estudió el efecto la tensión de oxígeno disuelto y la velocidad específica de crecimiento, sobre el grado de acetilación del alginato. Este estudio se realizó con la finalidad de identificar cómo estas condiciones de cultivo afectan el grado de acetilación de los alginatos sintetizados por *A. vinelandii*, y otras respuestas fisiológicas relacionadas con el proceso de acetilación de los alginatos.

De esta manera, se pretende contribuir en la generación de conocimiento relacionado con el proceso de acetilación de los alginatos sintetizados por *A. vinelandii*; para poder diseñar en un futuro estrategias de producción y de ingeniería de rutas metabólicas para la obtención de alginatos con grados de acetilación definidos.

### **3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

#### **3.1. Hipótesis**

El grado de acetilación del alginato producido por *A. vinelandii* se favorece en condiciones de bajas tensiones de oxígeno disuelto y bajas velocidades específicas de crecimiento.

#### **3.2. Objetivos**

##### **3.2.1. Objetivo General**

Estudiar el efecto de la velocidad específica de crecimiento y de la tensión de oxígeno disuelto sobre la acetilación del alginato sintetizado por *A. vinelandii* ATCC9046.

##### **3.2.2 Objetivos específicos**

Estudiar en condiciones diazotróficas el efecto de la disponibilidad de oxígeno sobre la acetilación del alginato sintetizado por *A. vinelandii* y su relación con los cambios en el flujo de carbono.

Entender en cultivos en quimiostato bajo condiciones de fijación de nitrógeno, el papel de la tensión de oxígeno disuelto y la velocidad específica de crecimiento sobre la acetilación del alginato sintetizado por *A. vinelandii*.

## **4. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL**

Para lograr los objetivos propuestos en este estudio, la estrategia experimental se dividió en dos etapas.

En una primera etapa se evaluó, en cultivos diazotróficos y empleando glucosa como fuente de carbono, el efecto de los cambios en la disponibilidad de oxígeno sobre el grado de acetilación del alginato producido por *A. vinelandii*. Esta fase de la estrategia experimental se realizó empleando dos tipos de matraces agitados: bafleados y convencionales. En estos cultivos se evaluó el grado de acetilación del alginato y paralelamente se analizó el flujo de carbono empleando [<sup>13</sup>C<sub>1</sub>]-Glucosa.

Una vez, que en la primera etapa se confirmó (en cultivos diazotróficos) el efecto de disponibilidad de oxígeno sobre la acetilación del alginato producido por *A. vinelandii*, se procedió al estudio, en condiciones controladas, del efecto de la TOD y  $\mu$  sobre la acetilación del alginato. Con la finalidad de controlar la  $\mu$ , la segunda fase de la estrategia experimental, se realizó en cultivos quimiostato de 2 L (limitados por glucosa) considerando que en estos cultivos  $\mu$  es equivalente a D. En esta etapa se evaluaron tres condiciones de TOD (1, 5 y 9 %), en un intervalo de tasas de dilución (D) de 0.02 a 0.15 h<sup>-1</sup>. Además de la cuantificación del grado de acetilación del alginato, se realizó un seguimiento de otras respuestas fisiológicas relacionadas con el grado de acetilación del alginato, como la producción del alginato y del P3HB.



## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Cepa

Se utilizó la cepa nativa de *A. vinelandii* ATCC9046. La cepa se mantuvo en medio Burk sólido sin fuente de nitrógeno en tubos inclinados (slants) a 4 °C. La cepa se resembró mensualmente.

### 5.2 Medio de cultivo

En la Tabla 5.1 se describe la composición del medio Burk, empleado para el crecimiento y mantenimiento de la cepa de *A. vinelandii* ATCC9046. Las sales de potasio, la glucosa y el MOPS, se disuelven en agua destilada (900 mL) y se ajusta el pH del medio a 7.2 con NaOH 1N. El sulfato de calcio (50 mL) y las sales restantes (50 mL) se disuelven y esterilizan por separado. Las tres soluciones se esterilizan a 121 °C durante 20 minutos. Una vez estériles se mezclan en la campana de flujo laminar (Peña et al., 2000).

**Tabla 5.1.** Composición del medio de cultivo (Peña et al., 2000)

<b>Componente</b>	<b>Concentración</b> [g L <sup>-1</sup> ]
Glucosa	20
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.66
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.16
CaSO <sub>4</sub>	0.05
NaCl	0.2
MgSO <sub>4</sub>	0.2
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	0.0029
FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0.027
MOPS	1.42

### 5.3 Sistemas de cultivo

#### 5.3.1 Cultivos en matraces

##### 5.3.1.1 Preparación del inóculo

Para la evaluación del efecto de la disponibilidad de oxígeno en matraces agitados, el inóculo se preparó en matraces Erlenmeyer "bafleados" de 500 mL con 50 mL de medio Burk libre de nitrógeno, se empleó esta condición de cultivo para evitar la acumulación de P3HB en las

células del inóculo. Los matraces se inocularon con dos asadas de células crecidas previamente en caja Petri. Los matraces se incubaron a 30 °C y 200 rpm de agitación durante 24 h.

### **5.3.1.2 Condiciones de cultivo**

Para realizar las cinéticas de crecimiento en matraces, se evaluaron dos cultivos paralelos para cada una de las condiciones de cultivo evaluadas. La disponibilidad de oxígeno se manipuló mediante el tipo de matraz y el volumen de llenado. Para la condición denominada de "baja disponibilidad de oxígeno" se emplearon matraces convencionales de 500 mL con 100 mL de volumen de llenado y, en la condición de "alta disponibilidad de oxígeno" se utilizaron matraces "bafleados" de 500 mL con 50 mL de volumen de llenado. Cada matraz se inoculó con la décima parte de su volumen final. Durante el desarrollo de estos cultivos se tomó una muestra cada hora durante la fase exponencial y cada 4 o 6 horas en el transcurso de la fase estacionaria. Se tomaron muestras de 2 mL para cada punto; 1 mL de cada muestra se utilizó para cuantificar peso seco y 1 mL para cuantificar alginato, P3HB y glucosa. Sólo en esta etapa y debido a la disponibilidad de equipo los matraces se incubaron a 30 °C y 200 rpm.

### **5.3.1.3 Medición de la TOD en los cultivos en matraces**

La medición de la TOD en los cultivos en matraces se realizó empleando sensores de oxígeno no-invasivos (PRESENS GmbH, Regensburg, Alemania) descritos por Schneider et al., (2010). Este sistema consiste en sensores ópticos de TOD a base de fluoróforos, los cuales son adheridos al fondo de los matraces. La medición de TOD en este sistema se basa en la excitación de los fluoróforos a 505 nm y la desactivación de la emisión de fluorescencia, la cual es proporcional a la presencia del oxígeno. La calibración del sistema se realizó para cada matraz empleando aire (100 %), en agua, a 200 rpm y 30°C.

## **5.3.2 Cultivos en fermentador**

### **5.3.2.1 Preparación de inóculo**

Para el cultivo en fermentador se preparó el inóculo en matraces Erlenmeyer de 500 mL con 100 mL de medio Burk libre de nitrógeno. Los matraces se inocularon con dos asadas de células crecidas previamente en caja Petri. Los matraces se incubaron a 29 °C y 200 rpm de agitación durante 24 h.

### **5.3.2.2 Condiciones de cultivo**

Se empleo un fermentador Applikon (Schiedam, Netherlands), de 3 L de volumen nominal con un volumen de trabajo de 2 L, equipado con dos impulsores tipo turbina Rushton (4.5 cm de diámetro) y un difusor de 7 orificios. Se utilizaron 4 puertos del reactor: uno para inoculación y adición de sales, otro para muestreo, uno más para la adición de NaOH y finalmente otro para la adición de antiespumante.

La tensión de oxígeno disuelto (TOD) se controló a 1, 5 y 9%, estos valores se establecieron con base en trabajos previos (Peña et al., 2000; Sabra et al., 1999,2000; Trujillo-Roldán et al., 2004), en los que se describió que bajo estas condiciones de TOD se favorecía la biosíntesis de alginato. Para el seguimiento de la TOD se empleó un electrodo polarográfico marca Applisens (Applikon, USA). El control de la TOD se realizó en línea por mezcla de gases ( $O_2$  y  $N_2$ ) empleando dos controladores de flujo másico. El control de la mezcla del flujo de alimentación se llevó a cabo empleando un controlador proporcional integral derivativo (PID) (Controlador Digital Universal UDC 1200 MICRO PRO), en la Tabla 5.2 se presentan los valores de las constantes P, I y D. El flujo total entregado por el equipo fue de  $1\text{ L min}^{-1}$ , equivalente a 0.5 vvm para 2 L de medio. Los perfiles de TOD característicos se presentan en el Anexo II.

La agitación se mantuvo constante a 300 rpm. El control de pH se realizó mediante la adición de NaOH 2 N con una bomba peristáltica, la temperatura se controló a 29 °C con una chaqueta térmica (Applikon).

**Tabla 5.2.** Valores de las constantes P, I y D del Controlador Digital Universal UDC 1200 MICRO PRO

<b>Constante</b>	<b>Valor</b>
P	850 %
D	0.31 min
I	2.04 s

### **5.3.2.3 Cultivos en quimiostato**

Los cultivos en quimiostato se realizaron en el fermentador Applikon descrito en el apartado 5.3.2.2. Para mantener el cultivo en quimiostato se emplearon dos puertos adicionales, uno para la alimentación de medio y otro para la cosecha del caldo de fermentación, el cual se adaptó como nivel para el control del volumen dentro del reactor. La alimentación y la cosecha se

realizaron con una bomba peristáltica de doble cabezal. El flujo se controló por la línea de alimentación, empleando una manguera de silicón Masterflex L/S 14 (1.6 mm DI).

Cada cultivo inició con un periodo de cultivo en lote, llevándose el seguimiento del crecimiento celular cada hora durante la fase exponencial. Una vez que las lecturas de absorbancia a 560 nm alcanzaron valores entre 0.8 y 1.0 se inició la alimentación y cosecha del cultivo.

Los cultivos se mantuvieron durante al menos seis tiempos de residencia ( $\tau$ ). Durante los primeros tres se siguió el crecimiento celular y en los últimos tres se realizó el muestreo para analizar el grado de acetilación, concentración de alginato y P3HB. Para cada tasa de dilución se tomaron muestras cada  $\tau$ .

## **5.4 Determinaciones analíticas**

### **5.4.1. Crecimiento celular**

El crecimiento celular se evaluó por densidad óptica a 560 nm (5.4.1.1) y peso seco (secciones 5.4.1.2 y 5.4.1.3)

#### **5.4.1.1. Evaluación del crecimiento celular por densidad óptica**

Se realizó el seguimiento de la densidad celular en un espectrofotómetro a 560 nm. Las muestras se diluyeron entre 10 y 50 veces dependiendo de la fase del cultivo, para garantizar que las lecturas fueran inferiores a 1.0 (Castillo et al., 2013b).

#### **5.4.1.2. Evaluación del crecimiento celular por peso seco en tubos Eppendorf.**

Se secaron tubos Eppendorf de 1.5 mL en una estufa a 80° C durante 20 h, hasta alcanzar peso constante. Los tubos secos se pesaron y se les adicionó 1 mL de muestra, posteriormente los tubos se centrifugaron a 16,100 x g durante 15 min a 4° C. El sobrenadante se recuperó para la cuantificación de alginato y glucosa. Los tubos con biomasa se secaron en la estufa a 80° C durante 20 h hasta alcanzar un peso constante. Finalmente, los tubos con biomasa se pesaron y se determinó el peso seco por diferencia de peso entre los tubos con muestra y los tubos vacíos (Castillo et al., 2013b).

#### **5.4.1.3. Evaluación del crecimiento celular por peso seco en membranas**

Se recuperaron 10 mL de caldo de cultivo, los cuales se centrifugaron a 10,552 x g durante 15 minutos. El sobrenadante se separó para la cuantificación de alginato por peso seco, y la pastilla celular se filtró, en membranas de acetato de celulosa (0.2  $\mu\text{m}$ , Sartorius Biolab Products), las membranas se secaron a 80 °C durante 20 h y finalmente se pesaron.

#### **5.4.2. Cuantificación de glucosa y ácidos orgánicos en el caldo de cultivo**

Para la cuantificación de glucosa y ácidos orgánicos, se recuperó 1 mL de caldo de cultivo en tubos Eppendorf de 1.5 mL, se separó el sobrenadante de la biomasa y se recuperó, como se describió en el apartado 5.4.1.2. La cuantificación de glucosa y ácidos orgánicos, se realizó por HPLC empleando una columna Aminex HPX-87H (300 X 7.8 mm) (Biorad, Hércules, CA, USA) y  $\text{H}_2\text{SO}_4$  7mM como fase móvil. Las muestras se diluyeron en agua Milli Q para alcanzar concentraciones dentro de la curva de calibración (1-50 mM). En la Tabla 5.3 se describe el método cromatográfico (Delis, 2009). Cabe mencionar, que bajo ninguna de las condiciones de cultivo evaluadas en el presente estudio se detectaron ácidos orgánicos en el caldo de cultivo, en el Anexo III se incluyen los cromatogramas característicos de glucosa, acetato y una muestra de sobrenadante.

#### **5.4.3. Cuantificación de alginato**

La cuantificación del alginato se realizó por el método colorimétrico y por peso seco (Castillo et al., 2013a, 2013b).

##### **5.4.3.1 Cuantificación de alginato por el método colorimétrico**

La cuantificación del alginato se realizó directamente en el sobrenadante empleando el método de Carbazol modificado (Knutson y Jeanes, 1967). La técnica se adaptó para los siguientes volúmenes: 1.2 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ -Borato, 140  $\mu\text{L}$  de muestra y 40  $\mu\text{L}$  de la solución de carbazol - etanol absoluto. El método fue lineal de 0 a 300  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de alginato. Las muestras se diluyeron hasta alcanzar concentraciones dentro de este intervalo. La curva de calibración se elaboró con alginato algal de viscosidad media (Sigma-Aldrich).

##### **5.4.3.2 Cuantificación de alginato por peso seco**

La recuperación del sobrenadante para cuantificar la concentración de alginato por peso seco, se llevó a cabo como se describió en la sección 5.4.1.3. Posteriormente, a los 10 mL de sobrenadante se le adicionaron 3 volúmenes de isopropanol frío para precipitar el alginato, el

cual se filtró en membranas de acetato de celulosa (0.2  $\mu\text{m}$ , Sartorius Biolab Products), las membranas se secaron a 80 °C durante 20 h y se pesaron.

#### 5.4.4. Cuantificación del grado de acetilación del alginato

Para cuantificar el grado de acetilación, se adaptó la técnica descrita por Cheetman y Punruckvong (1985). Para recuperar el alginato, se centrifugaron 10 mL de caldo de cultivo a 10,552 x g durante 15 minutos, se recuperó el sobrenadante, y se le adicionaron 3 volúmenes de isopropanol frío para precipitar el alginato. El alginato se separó y se secó a 70°C durante 12 h. Posteriormente, se pesaron en un tubo Eppendorf de 2 mL, entre 3 y 10 mg de alginato seco y se solubilizaron en 500  $\mu\text{L}$  de agua Milli Q. A la solución de alginato se le adicionaron 500  $\mu\text{L}$  de NaOH 1 N y la mezcla se incubó a 80 °C, a 700 rpm durante 2 h. Al finalizar la reacción la mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente y se adicionaron 625  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  1.5 M para acidificar el extracto final. El extracto acidificado se centrifugó a 11,160 x g durante 15 min para separar al alginato residual del extracto. El extracto filtrado se analizó por HPLC, con una columna Aminex HPX-87H (Biorad). En la Tabla 5.3 se detalla el método cromatográfico empleado para la cuantificación de los acetilos.

**Tabla 5.3.** Descripción del método cromatográfico para la cuantificación de glucosa, acetilos y P3HB.

<b>Condiciones cromatográficas</b>	<b>Acetilos</b>	<b>P3HB</b>	<b>Glucosa/ácidos orgánicos</b>
Flujo ( $\text{mL min}^{-1}$ )	0.65	0.65	0.8
Temperatura (°C)	50	50	40
Volumen de inyección ( $\mu\text{L}$ )	40	20	20
Detector	PDA	PDA	IR/PDA
Longitud de onda (nm)	210	220	210
Fase móvil	$\text{H}_2\text{SO}_4$ 7mM	$\text{H}_2\text{SO}_4$ 7mM	$\text{H}_2\text{SO}_4$ 7mM

#### 5.4.5. Cuantificación de P3HB

La cuantificación de P3HB, se basó en la conversión de P3HB en ácido crotónico por hidrólisis con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado. En tubos Eppendorf de 1.5 mL se pesaron entre 1 y 3 mg de biomasa liofilizada, posteriormente se adicionó 1 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado. La mezcla se calentó a 90 °C durante 1 h. Se recuperó el extracto después de la digestión y se diluyó (1:10) con agua Milli

Q. El análisis se realizó por HPLC empleando una columna Aminex HPX-87H (Biorad). En la Tabla 5.2 se detalla el método cromatográfico empleado.

## **5.5 Experimentos con marcaje isotopomérico**

El análisis de flujo metabólico (AFM), es una herramienta que permite conocer y entender los flujos intracelulares de carbono y su regulación (Wittman y Heinzle, 2002). El AFM proporciona un mapa de flujo donde se describen las principales reacciones intracelulares de los organismos y da un estimado de la velocidad con la que cada reacción ocurre (Wiechert, 2001). Una de las ventajas del AFM, es que permite evaluar la rigidez o flexibilidad de los nodos de ramificación metabólica bajo diferentes condiciones de cultivo.

El empleo de sustratos marcados con isótopos por ejemplo,  $^{13}\text{C}$ , permite realizar el AFM. En este tipo de análisis, se evalúa mediante la adición de un sustrato marcado ( $^{13}\text{C}$ ) a un sistema biológico, la incorporación y distribución de los átomos marcados en la red metabólica. Posteriormente, el enriquecimiento isotopomérico de los metabolitos sintetizados *de novo* se puede medir empleando cromatografía de gases – espectrometría de masas (GC-MS) o resonancia magnética nuclear (NMR) (Wiechert, 2001).

En el presente trabajo, el AFM *in vivo* se realizó empleando [ $^{13}\text{C}$ -1]-Glucosa como fuente de carbono. La evaluación de las rutas metabólicas *in vivo* y de la distribución de carbono a lo largo del metabolismo central se realizó siguiendo el patrón de marcaje de los aminoácidos proteinogénicos por GC/MS. En el Anexo IV se presentan los aminoácidos evaluados.

### **5.5.1 Hidrólisis de proteína**

Para realizar la evaluación por cromatografía de gases - espectrometría de masas, se tomaron muestras en dos puntos de la fase exponencial para cada condición, la concentración de biomasa fue de 0.8 y 0.9  $\text{g L}^{-1}$  para los cultivos en matraces convencionales, y de 1.0 y 1.5  $\text{g L}^{-1}$  en los cultivos desarrollados en matraces bafleados. Las células se centrifugaron durante 10 min a 16,100 x g a 4 °C. La biomasa se recuperó y se lavó dos veces con agua Milli Q. Posteriormente, en tubos Eppendorf de 1.5 mL, las células se hidrolizaron con HCl 6 M (50  $\mu\text{L}$  X g de células) a 100 °C durante 24 h, la incubación se realizó en una estufa. Las muestras hidrolizadas se neutralizaron (pH 6-7) con NaOH 6 M. Las muestras neutralizadas se filtraron con filtros Ultrafree-MC (0.22  $\mu\text{m}$ ) durante 10 min a 16,100 x g a 4 °C y finalmente se liofilizaron (Delis, 2009; Castillo et al., 2013a).

### **5.5.2 Derivatización**

Los liofilizados celulares se disolvieron en 50  $\mu\text{L}$  de Dimetilformamida/piridina 0.1 % y 50  $\mu\text{L}$  del reactivo de derivatización N-metil-N-tert-butildimetilsilil-trifluoroacetamida (MBDSTFA) y se incubaron a 80 °C. Posteriormente, los extractos se centrifugaron a 16,100 x g durante 10 min a 4 °C para retirar las sales resultantes de la neutralización. Los extractos libres de sales se transfirieron a viales para el análisis de GC-MS (Delis, 2009; Castillo et al., 2013b).

### **5.5.3. Cromatografía de gases –espectrometría de masas**

Para el análisis cromatográfico se empleó un cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas HP6890 con una columna HP-5-MS. La temperatura en el inyector fue de 300 °C. Las condiciones de separación fueron las siguientes: la temperatura inicial fue de 120 °C durante 5 min, con un incremento de temperatura a 4 °C por minuto hasta alcanzar los 270 °C. Posteriormente, la temperatura se incrementó a una velocidad de 20 °C por minuto hasta alcanzar los 320 °C. La detección se realizó con un detector de cuadrupolo a 320 °C. El volumen de inyección fue de 1  $\mu\text{L}$  en modo "splitless" (Delis, 2009; Castillo et al., 2013b). La adquisición de datos del espectrómetro de masas se realizó en modo SIM (monitoreo selectivo de iones por sus siglas en inglés), en el Anexo IV se especifican los iones que fueron monitoreados en los aminoácidos proteinogénicos evaluados.

La integración de los espectros de masa se realizó con el programa en ambiente MATLAB R2008b (The MathWorks Inc., Nattick, MA, USA) descrito por Yang et al., 2008.

### **5.5.4. Análisis de flujo metabólico (*in silico*)**

El análisis de flujo metabólico se realizó empleando el modelo de simulación numérica descrito por Yang et al., 2008, en ambiente MATLAB R2008b (The MathWorks Inc., Nattick, MA, USA). En el Anexo IV, se presentan las reacciones empleadas para el análisis de flujo metabólico.

## **5.6. Análisis estadístico**

El análisis estadístico, de los datos que se presentan se realizó empleando el programa Microsoft Excel 2007. Se evaluó por la prueba "t de Student" dentro un intervalo de confianza del 95 %.

En el caso de los experimentos realizados en matraces los cultivos para cuantificación de biomasa, alginato, grado de acetilación del alginato y P3HB se realizaron por triplicado. Los análisis de flujo metabólico se realizaron por duplicado.



Los estudios en quimiostato se realizaron en tres cultivos independientes para cada condición y se evaluaron los últimos tres tiempos de residencia, una vez alcanzado el estado estable, para cada cultivo.

## **5.7. Expresiones matemáticas**

### **5.7.1 Expresiones matemáticas empleadas en los cultivos en lote**

#### **5.7.1.1 Velocidad específica de crecimiento**

La velocidad específica de crecimiento se calculó con base en la ecuación (Quintero, 1981; Stanbury et al., 2003):

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \quad \text{Ec. 5.7.1.}$$

Al integrar la ecuación y expresarla en función de  $\mu$  (Quintero, 1981; Stanbury et al., 2003):

$$\mu = \frac{\text{Ln}x - \text{Ln}x_0}{t} \quad \text{Ec. 5.7.2}$$

Considerando  $\mu$  ( $\text{h}^{-1}$ ) como la pendiente de la recta al graficar  $\text{Ln}(x)$  vs  $t$ , en donde  $x$  representa a la biomasa ( $\text{g L}^{-1}$ ) y  $t$  el tiempo (h).

#### **5.7.1.2 Velocidad específica de consumo de glucosa**

La velocidad específica de consumo de glucosa se calculó con base en la ecuación descrita por Delis (2009):

$$q_G = - \frac{dG}{dt} \frac{1}{x} \quad \text{Ec. 5.7.3}$$

Considerando  $dG/dt$  ( $\text{g L}^{-1}\text{h}^{-1}$ ) como la pendiente de la recta al graficar la concentración de glucosa ( $G$ ;  $\text{g L}^{-1}$ ) vs  $t$  (h); siendo  $x$  ( $\text{g L}^{-1}$ ) la biomasa promedio en ese periodo de tiempo.

#### **5.7.1.3 Velocidad específica de producción de alginato**

La velocidad específica de producción de alginato se calculó con base en la ecuación descrita por Delis (2009):

$$q_{alg} = \frac{dAlg}{dt} \frac{1}{x} \quad \text{Ec. 5.7.4}$$

Considerando  $dAlg/dt$  ( $g L^{-1}h^{-1}$ ) como la pendiente de la recta al graficar la concentración de alginato ( $g L^{-1}$ ) vs  $t$  (h); siendo  $x$  ( $g L^{-1}$ ) la biomasa promedio en ese periodo de tiempo.

#### **5.7.1.4 Rendimiento de biomasa**

$$Y_{x/G} = \frac{dx}{dG} \quad \text{Ec. 5.7.5}$$

Considerando  $dx/dG$  como la pendiente de la recta al graficar la concentración de biomasa ( $g L^{-1}$ ) vs concentración de glucosa ( $g L^{-1}$ ) (Delis et al., 2009).

#### **5.7.1.5 Rendimiento de alginato**

$$Y_{Alg/G} = \frac{dAlg}{dG} \quad \text{Ec. 5.7.6}$$

Considerando  $dAlg/dG$  como la pendiente de la recta al graficar la concentración de alginato ( $g L^{-1}$ ) vs concentración de glucosa ( $g L^{-1}$ ) (Delis et al., 2009).

### **5.7.2 Expresiones matemáticas empleadas en los cultivos en quimiostato**

Los cultivos continuos en quimiostato, son cultivos a los que se les adiciona medio fresco a un flujo constante y se extrae caldo de cultivo a la misma velocidad, por lo que el volumen dentro del reactor permanece constante a lo largo del cultivo. En estos cultivos en donde el mezclado garantiza que la biomasa y los sustratos son homogéneos en todo el sistema, el crecimiento de biomasa es determinado por un sustrato (denominado sustrato limitante), el cual se encuentra a una concentración inferior con respecto a los otros sustratos presentes en el medio (Quintero, 1981).

#### **5.7.2.1 Tasa de dilución, concentración de biomasa y sustrato en el estado estable: teoría del quimiostato**

En los cultivos en quimiostato, el control del flujo del suministro del sustrato permite establecer estados metabólicos definidos, con base en la ecuación de Monod que establece la relación entre la velocidad específica de crecimiento y la concentración del sustrato (Quintero, 1981).

$$\mu = \frac{\mu_{max} S}{S + K_S} \quad \text{Ec. 5.7.7}$$

Siendo  $\mu_{max}$  ( $h^{-1}$ ) la velocidad específica de crecimiento máxima y  $K_S$  ( $g L^{-1}$ ) la constante de afinidad por el sustrato.

Considerando que en los cultivos en quimiostato la biomasa presente está determinada por la relación:

$$V \frac{dx}{dt} = V\mu x - Fx \quad \text{Ec. 5.7.8}$$

En dónde  $Vdx/dt$  es la biomasa en el sistema,  $V\mu x$  es el crecimiento y  $Fx$  es la biomasa en el flujo de salida, siendo  $V$  el volumen ( $L$ ) y  $F$  el flujo ( $L h^{-1}$ ).

Para un infinitesimal de tiempo la ecuación 5.7.8 se puede expresar como:

$$Vdx = V\mu xdt - Fxdt \quad \text{Ec. 5.7.9}$$

Dividiendo la ecuación anterior entre el volumen se obtiene:

$$dx = \mu xdt - \frac{F}{V} xdt \quad \text{Ec. 5.7.10}$$

En dónde la tasa de dilución  $D$  ( $h^{-1}$ ) se define como:

$$D = \frac{F}{V} \quad \text{Ec. 5.7.11}$$

Por lo que los cambios en la biomasa en estos sistemas se puede expresar como:

$$\frac{dx}{dt} = x(\mu - D) \quad \text{Ec. 5.7.12}$$

Una vez que en los cultivos en quimiostato se alcanza el estado estable, la biomasa es constante por lo que:

$$\frac{dx}{dt} = x(\mu - D) = 0 \quad \text{Ec. 5.7.13}$$

En resumen en los cultivos en quimiostato en estado estable se considera que:

$$\mu = D \tag{Ec. 5.7.14}$$

Finalmente el tiempo de residencia en el reactor ( $\tau$ ; h) se define por la ecuación:

$$\tau = \frac{1}{D} \tag{Ec. 5.7.15}$$

Por otra parte, los balances de sustrato limitante y biomasa están determinados por la ecuación 5.7.16 :

$$\frac{dS}{dt} = DS_o - DS - \frac{1}{Y}\mu x \tag{Ec. 5.7.16}$$

Siendo  $D$  la tasa de dilución ( $h^{-1}$ ),  $S_o$  la concentración de sustrato inicial ( $g L^{-1}$ ),  $S$  la concentración de sustrato residual ( $g L^{-1}$ ), y  $Y$  el rendimiento de biomasa con base al sustrato ( $g_{bio} g_g^{-1}$ ).

Considerando que en el estado estable:

$$\frac{dS}{dt} = 0$$

El balance de biomasa y sustrato se define como:

$$x = Y(S_o - S) \tag{Ec. 5.7.17}$$

Expresando el sustrato residual, en función de la ecuación de Monod (Ec. 5.7.7) se obtiene que en el estado estable (Quintero, 1981):

$$S = \frac{K_S D}{\mu_{max} + D} \tag{Ec. 5.7.18}$$

Reemplazando esta ecuación en la expresión de la biomasa ( $x$ ;  $g L^{-1}$ ) se obtiene (Quintero, 1981):

$$x = Y\left(S_o - \frac{K_S D}{\mu_{max} + D}\right) \tag{Ec. 5.7.19}$$

Sin embargo, es importante resaltar que se ha observado que en cultivos reales, estas consideraciones pueden presentar limitaciones y dependerán del sustrato empleado como sustrato limitante. En el caso particular de la limitación por fuente de carbono se ha descrito que el rendimiento es altamente dependiente de la tasa de dilución, observándose una disminución en los rendimientos de biomasa a bajas tasas de dilución. Este comportamiento se ha sugerido se debe al requerimiento energético empleado para realizar funciones de mantenimiento celular. Por lo que en el balance de consumo de sustrato se incluyen las siguientes consideraciones (Quintero, 1981):

Velocidad de consumo de glucosa = Consumo de glucosa para el crecimiento + Consumo de glucosa para el mantenimiento

Definiendo el consumo para el mantenimiento como:

$$\frac{dS_m}{dt} = m\chi \quad \text{Ec. 5.7.20}$$

En donde  $m$  ( $\text{g g}_{\text{bio}}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) es el coeficiente de mantenimiento.

$$\frac{\mu\chi}{Y} = \frac{\mu\chi}{Y_G} + m\chi \quad \text{Ec. 5.7.21}$$

Considerando  $Y_G$  como el rendimiento teórico máximo ( $\text{g}_{\text{bio}} \text{g}^{-1}$ ) y que  $\mu = D$

En los cultivos quimiostato se tiene:

$$\frac{1}{Y} = \frac{1}{Y_G} + \frac{m}{D} \quad \text{Ec. 5.7.22}$$

Al incorporar el concepto de energía de mantenimiento para calcular el crecimiento en los cultivos en quimiostato se obtiene (Quintero, 1981):

$$\chi = \frac{DY_G (S_0 - S)}{D + mY_G} \quad \text{Ec. 5.7.23}$$

### 5.7.2.2 Velocidad de transferencia de oxígeno y consumo específico de oxígeno

En los cultivos en biorreactor, las velocidades de transferencia de oxígeno y de consumo específico de oxígeno se calcularon tomando las siguientes consideraciones: a) el flujo de la mezcla de gases, oxígeno y nitrógeno, fue constante, b) en estado estable la composición de la mezcla de gases se mantuvo constante para cada condición evaluada, y c) la concentración molar del oxígeno al equilibrio en el flujo de entrada ( $C_g$ ; mmol L<sup>-1</sup>) fue proporcional al flujo de oxígeno ( $F_{O_2}$ ; mol L<sup>-1</sup>) con respecto al flujo total gases ( $F_T$ ; mol L<sup>-1</sup>).

Por lo que la ecuación para calcular la concentración molar del oxígeno al equilibrio fue:

$$C_g = C_g^* \frac{F_{O_2}}{F_T} \quad \text{Ec. 5.7.24}$$

En dónde  $C_g^*$  (mmol L<sup>-1</sup>) es la fracción molar del oxígeno en el aire.

A partir de estas consideraciones la velocidad de transferencia de oxígeno (VTO; mmol L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) se calculó a partir de la ecuación:

$$VTO = k_l a (C_g - C_L) \quad \text{Ec. 5.7.25}$$

En dónde:  $k_l a = 25 \text{ h}^{-1}$ , es el coeficiente de transferencia de oxígeno por unidad de área, el cual se calculó empleando el método de *gassing out* con nitrógeno (Stanbury et al., 2003).  $C_L$  (mmol L<sup>-1</sup>) es la concentración oxígeno, presente en el reactor, equivalente a la concentración molar de oxígeno para las tres condiciones de TOD evaluadas (1, 5 y 9 %).

Para los cultivos en quimiostato en condiciones de TOD constantes y en estado estable, la VTO es igual a la velocidad de consumo de oxígeno (VCO) (Stanbury et al., 2003), por lo que la velocidad específica de consumo de oxígeno  $q_{O_2}$  (mmol g<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>) se calculó empleando la siguiente ecuación:

$$q_{O_2} = \frac{VCO}{x} = \frac{VTO}{x} \quad \text{Ec. 5.7.26}$$

En dónde  $x$  (g L<sup>-1</sup>) es la concentración de biomasa en el estado estable.

Finalmente, conociendo la VTO también fue posible calcular el coeficiente respiratorio (RQ; -), para lo cual se plantearon las siguientes consideraciones: a) el sustrato residual en todas las

condiciones de cultivo fue cercano a cero y b) el sustrato fue distribuido en: biomasa, P3HB y alginato, por lo que %C-mol que no se empleó en estos productos fue transformado en CO<sub>2</sub>. A partir del % C-mol de CO<sub>2</sub> se estimó la velocidad de producción de CO<sub>2</sub> (VPC; mmol L<sup>-1</sup>), siendo la ecuación que define el RQ:

$$RQ = \frac{VPC}{vCO} \qquad \text{Ec. 5.7.27}$$

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6. 1 Estudio de la acetilación de los alginatos sintetizados por *A. vinelandii* sin control de la tensión de oxígeno disuelto y la velocidad específica crecimiento (cultivos en matraces agitados bajo diferentes condiciones de disponibilidad de oxígeno)

#### 6.1.1 Condiciones de estudio: alta y baja disponibilidad de oxígeno

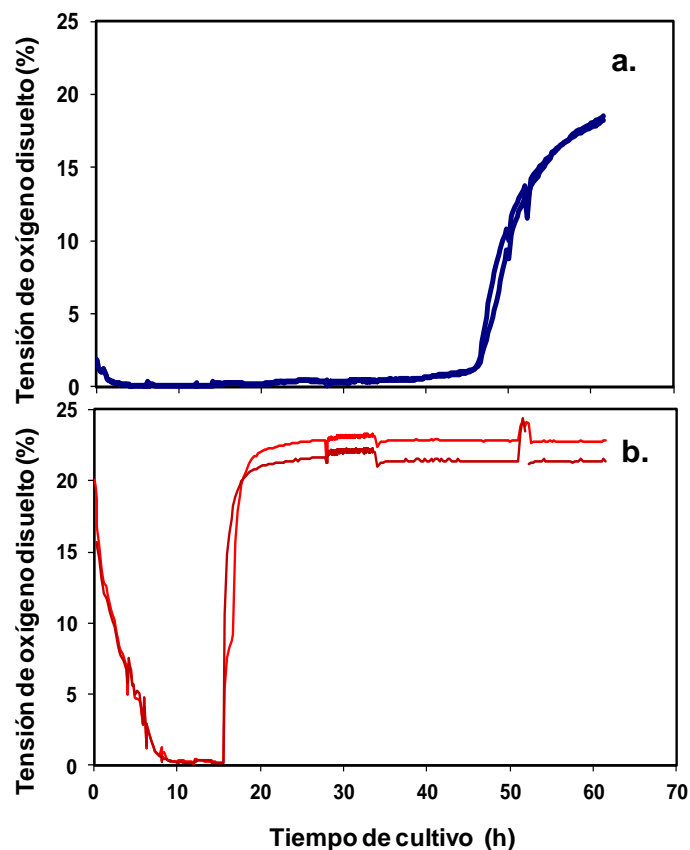
Con la finalidad de evaluar el efecto de dos condiciones extremas de disponibilidad de oxígeno sobre el grado de acetilación del alginato producido por *A. vinelandii* en cultivos diazotróficos se utilizaron matraces agitados. El uso de matraces agitados para el cultivo celular ha sido ampliamente utilizado debido a que son sistemas sencillos que permiten la evaluación de cultivos en paralelo, siendo una herramienta de gran utilidad para la caracterización de cepas, selección de medios de cultivo y en estudios de análisis de flujo metabólico (Schneider et al., 2010). Entre las estrategias que se emplean para manipular la disponibilidad de oxígeno en este tipo de cultivos se encuentran: el uso de diferentes tipos de matraces, "bafleados" y convencionales, (Büchs, 2001); así como la variación del volumen de llenado y la frecuencia de agitación (Maier y Büchs, 2001).

En el caso del tipo de matraces, la introducción de "baffles" (matraces bafleados) genera un patrón de flujo predominantemente turbulento (Klöeckner y Büchs, 2012), lo cual se refleja en un incremento considerable de la velocidad de transferencia de oxígeno máxima ( $VTO_{max}$ ) aún a bajas frecuencias de agitación (Büchs, 2001). Por otra parte, la disminución en el volumen de llenado se refleja en un incremento en el área de transferencia gas-líquido ( $a$ ), impactando positivamente la  $VTO_{max}$  (Maier y Büchs, 2001). En este sentido Peña et al (2007), reportaron en cultivos de *A. vinelandii* que la disminución del volumen de llenado de 100 a 25 mL en matraces de 500 mL incrementaba la  $VTO_{max}$  de  $5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  a  $20 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

Cabe mencionar, que tanto el tipo de matraz como el volumen de llenado no sólo afectan la  $VTO_{max}$ , sino que también tienen un efecto sobre la potencia volumétrica (Büchs et al., 2000; Cyrill et al., 2006), siendo este un parámetro crítico en cultivos de células sensibles al estrés hidrodinámico como son las células animales y vegetales (Büchs et al., 2000). Sin embargo, en el caso específico de *A. vinelandii* se ha observado que tanto en condiciones de TOD controladas (Lozano et al., 2011), como en cultivos sin control de TOD en matraces (Peña et al., 2011b) y en fermentador (Díaz-Barrera et al., 2006, 2011), la disponibilidad de oxígeno expresada como  $VTO_{max}$ , y no el estrés hidrodinámico, es la variable que podría tener un mayor impacto sobre la biosíntesis de alginato. Por lo tanto la discusión se centrará en el efecto de la



disponibilidad de oxígeno sobre el metabolismo de *A. vinelandii* y su posible relación con el grado de acetilación del alginato.



**Figura 6.1.** Perfil de oxígeno disuelto de los cultivos de *A. vinelandii* ATCC 9046 bajo condiciones de baja (a) y alta disponibilidad de oxígeno (b). La calibración del sensor de oxígeno se realizó con saturación de aire.

Con base en lo anterior se evaluaron dos condiciones de cultivo, las cuales se establecieron modificando el tipo de matraz y el volumen de llenado. La primera condición denominada de "alta disponibilidad de oxígeno" se logró empleando matraces "bafleados" de 500 mL con 50 mL de volumen de llenado; la segunda condición denominada de "baja disponibilidad de oxígeno", se logró empleando matraces convencionales de 500 mL con 100 mL de volumen de llenado. En la Figura 6.1 se presentan los perfiles de tensión de oxígeno disuelto que se alcanzaron bajo estas condiciones de cultivo. En esta se observa que en la condición denominada de "baja disponibilidad de oxígeno" (matraces convencionales), la TOD fue cercana a 0 % por un periodo de 40 h; en contraste en la condición denominada de "alta disponibilidad de oxígeno" durante las primeras 8 horas de cultivo los valores de TOD fueron mayores a 0 %.

### 6.1.2 Crecimiento y consumo de glucosa

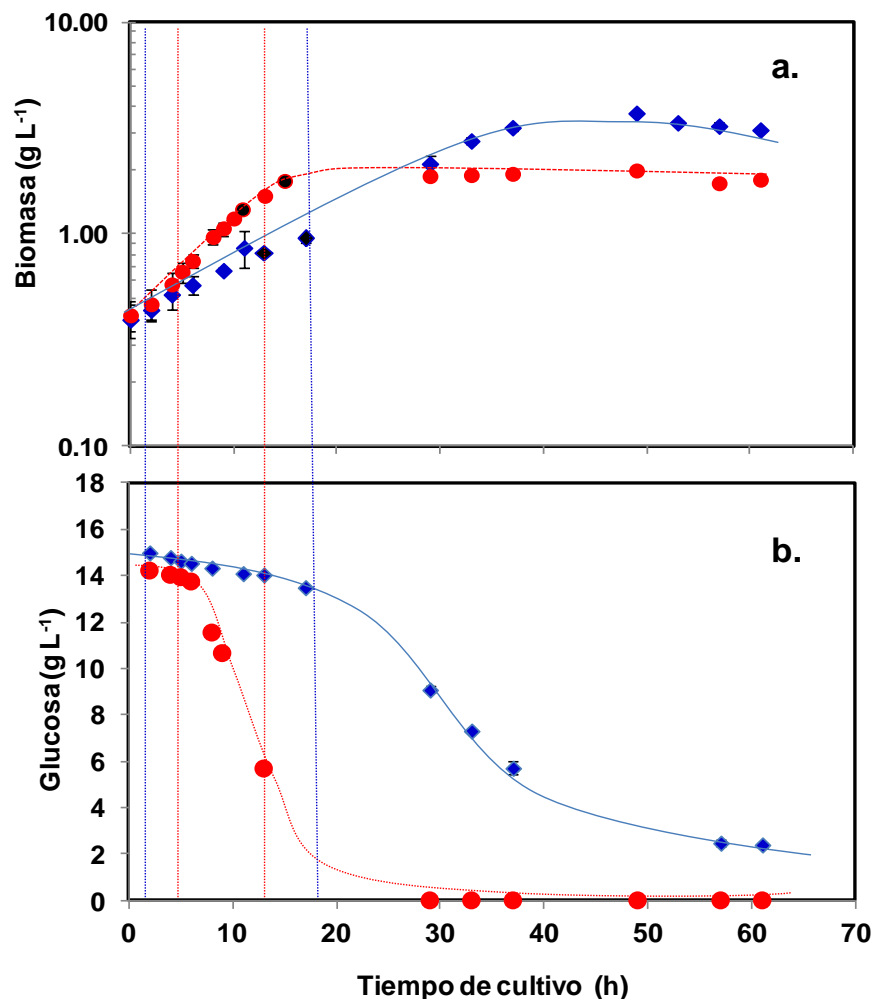
Como se observa en las Figuras 6.2a y b, las condiciones de aireación impactaron el crecimiento y el consumo de glucosa, así como los parámetros cinéticos y estequiométricos (Tabla 6.1). En lo que se refiere a la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), esta fue de  $0.08 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$  para los cultivos desarrollados en los matraces convencionales y de  $0.17 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$  para los cultivos en los matraces "bafleados". En trabajos previos en cultivos de *A. vinelandii* ya se había descrito un comportamiento semejante en lo que se refiere a los valores de  $\mu$ . Peña et al., (1997) reportaron valores de  $\mu$  de  $0.09 \text{ h}^{-1}$  en matraces convencionales y de  $0.15 \text{ h}^{-1}$  en matraces bafleados.

**Tabla 6.1** Parámetros cinéticos de los cultivos en matraces agitados bajo diferentes condiciones de disponibilidad de oxígeno.

Condición de cultivo	$\mu$ [h <sup>-1</sup> ]	$Y_{X/S}$ [g <sub>biomasa</sub> g <sub>glucosa</sub> <sup>-1</sup> ]	$q_s$ [g h <sup>-1</sup> g <sub>biomasa</sub> <sup>-1</sup> ]
Matraces bafleados	$0.17 \pm 0.01$	$0.10 \pm 0.01$	$1.15 \pm 0.02$
Matraces convencionales	$0.08 \pm 0.01$	$0.36 \pm 0.01$	$0.12 \pm 0.01$

La velocidad específica de consumo de glucosa ( $q_s$ ) también se vio afectada por los cambios en la disponibilidad de oxígeno, alcanzando un valor casi 10 veces mayor en los cultivos en los matraces bafleados con respecto a los cultivos desarrollados en condiciones de baja disponibilidad de oxígeno. Se observó en los cultivos desarrollados en los matraces convencionales que la glucosa no se agotó aún cuando el cultivo llegó a la fase estacionaria, siendo este un comportamiento característico de los cultivos de *A. vinelandii* en condiciones de limitación de oxígeno (Peña et al., 2011b). En contraste, en los cultivos desarrollados en los matraces bafleados, la fase estacionaria se alcanzó al agotarse la fuente de carbono.

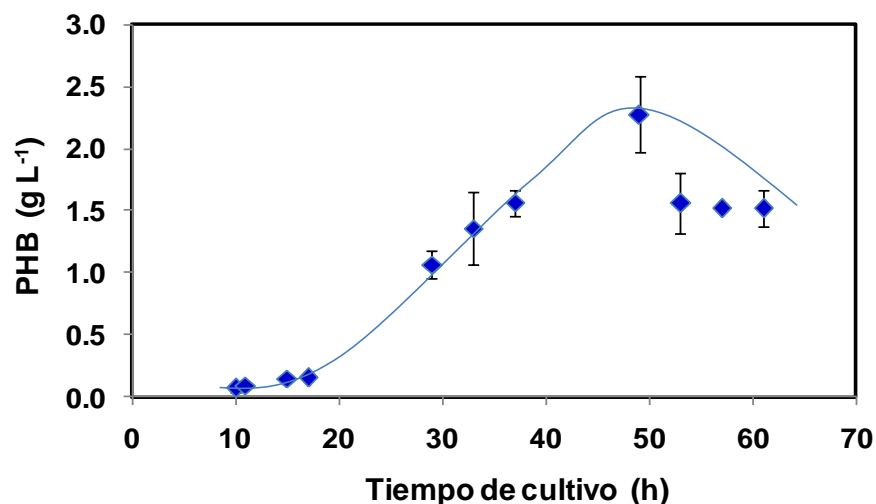
En lo que se refiere a los rendimientos de biomasa ( $Y_{X/S}$ ), estos fueron más altos en aquellos cultivos desarrollados en condiciones de baja disponibilidad de oxígeno. Este comportamiento puede deberse al hecho de que los cultivos se desarrollaron en condiciones de fijación de nitrógeno; y en *A. vinelandii* se ha descrito que en condiciones de alta aireación el proceso de fijación de nitrógeno requiere un gasto energético adicional en lo que se conoce como "protección respiratoria" del sistema nitrogenasa (Oelze, 2000; Setubal et al., 2009), lo cual se refleja en los bajos rendimientos de biomasa, en los cultivos desarrollados en matraces bafleados.



**Figura 6.2.** Cinéticas de crecimiento de *A. vinelandii* ATCC 9046 (a) y de consumo de glucosa (b) bajo condiciones de baja ( $\blacklozenge$ ) y alta ( $\bullet$ ) disponibilidad de oxígeno. Las líneas indican la etapa del cultivo en la que se calcularon  $Y_{XS}$  y  $q_s$  en los matraces convencionales (azul) y bafleados (rojo). Los puntos en negro indican los puntos de muestreo para el análisis de flujo metabólico.

### 6.1.3. Producción de P3HB

La producción de P3HB (Fig. 6.3), solo se observó en los cultivos desarrollados en condiciones de baja aireación. El P3HB es un polímero intracelular que se acumula en diversas especies bacterianas en condiciones de limitación nutricional, en el caso de *A. vinelandii*, se acumula principalmente cuando existe limitación por oxígeno (Peña et al., 2011a).

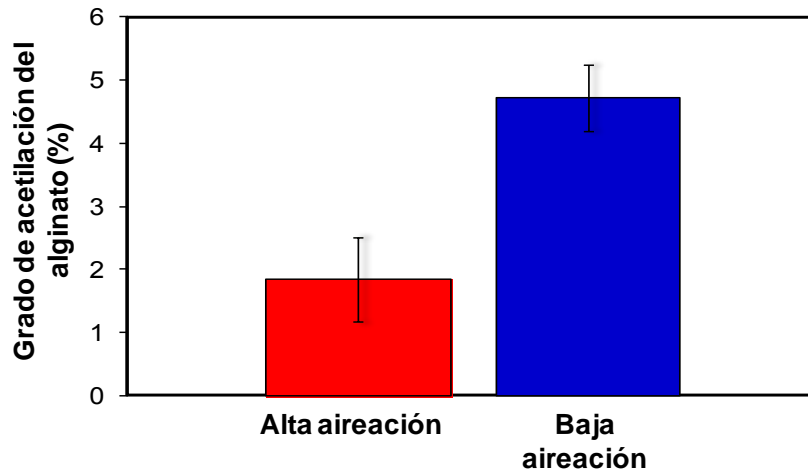


**Figura 6.3.** Cinética de producción de P3HB en condiciones de baja disponibilidad de oxígeno.

#### 6.1.4 Grado de acetilación del alginato y producción de alginato

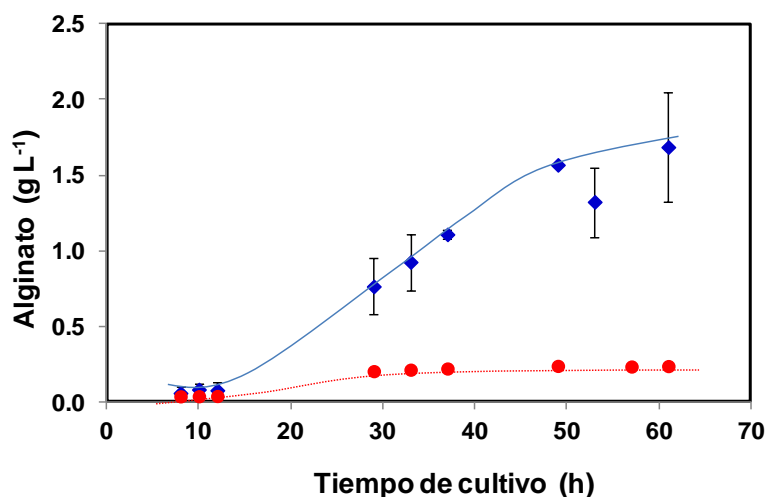
En la Figura 6.4 se presenta el grado de acetilación del alginato, en donde se observa que las diferencias en la disponibilidad de oxígeno, no sólo afectaron los parámetros cinéticos descritos previamente, también se reflejaron en el grado de acetilación del alginato producido por *A. vinelandii*, el cual fue mayor (2.6 veces) en los cultivos desarrollados en condiciones de baja disponibilidad de oxígeno ( $4.7 \pm 0.5$  %) con respecto a la acetilación de los alginatos obtenidos en cultivos desarrollados en condiciones de alta disponibilidad de oxígeno ( $1.8 \pm 0.7$  %). Estos resultados coinciden con lo descrito previamente por Peña et al. (2011b), con respecto a que la acetilación del alginato es mayor en condiciones de baja transferencia de oxígeno. No obstante, es importante señalar que el presente trabajo se realizó en condiciones de fijación de nitrógeno, las cuales como describieron previamente Zapata-Vélez y Trujillo-Roldán (2010), tienen un impacto importante sobre el comportamiento de otros parámetros como el PMP del alginato.

La producción de alginato (Fig 6.5), al igual que el grado de acetilación del alginato, fue mayor en la condición de baja disponibilidad de oxígeno, en la que se obtuvo una concentración final de alginato de  $1.69 \pm 0.36$  g L<sup>-1</sup>; en contraste con los cultivos en alta aireación (matraces bafleados) en los cuales la concentración de alginato no fue mayor a  $0.23 \pm 0.02$  g L<sup>-1</sup>. Este comportamiento corresponde con lo descrito previamente por Peña et al. (1997), quienes encontraron que la producción de alginato por *A. vinelandii* en cultivos desarrollados en matraces convencionales fue mayor con respecto a la producción de este polímero en matraces bafleados. Sin embargo, si se observó una disminución importante en lo que se refiere a las



**Figura 6.4.** Grado de acetilación del alginato en condiciones de alta y baja disponibilidad de oxígeno.

concentraciones de alginato ( $4 \text{ g L}^{-1}$  en la condición de baja aireación y  $1 \text{ g L}^{-1}$  en la condición de alta aireación) reportadas por Peña et al. (1997), quienes emplearon extracto de levadura como fuente nitrogenada. No obstante, los bajos rendimientos de alginato en condiciones diazotróficas ya habían sido previamente observados por Zapata-Vélez y Trujillo-Roldán (2010), quienes reportaron en cultivos diazotróficos de *A. vinelandii*, en matraces convencionales una concentración máxima de alginato de  $1.7 \text{ g L}^{-1}$ .



**Figura 6.5.** Cinéticas de producción de alginato en condiciones de baja ( $\blacklozenge$ ) y alta ( $\bullet$ ) disponibilidad de oxígeno

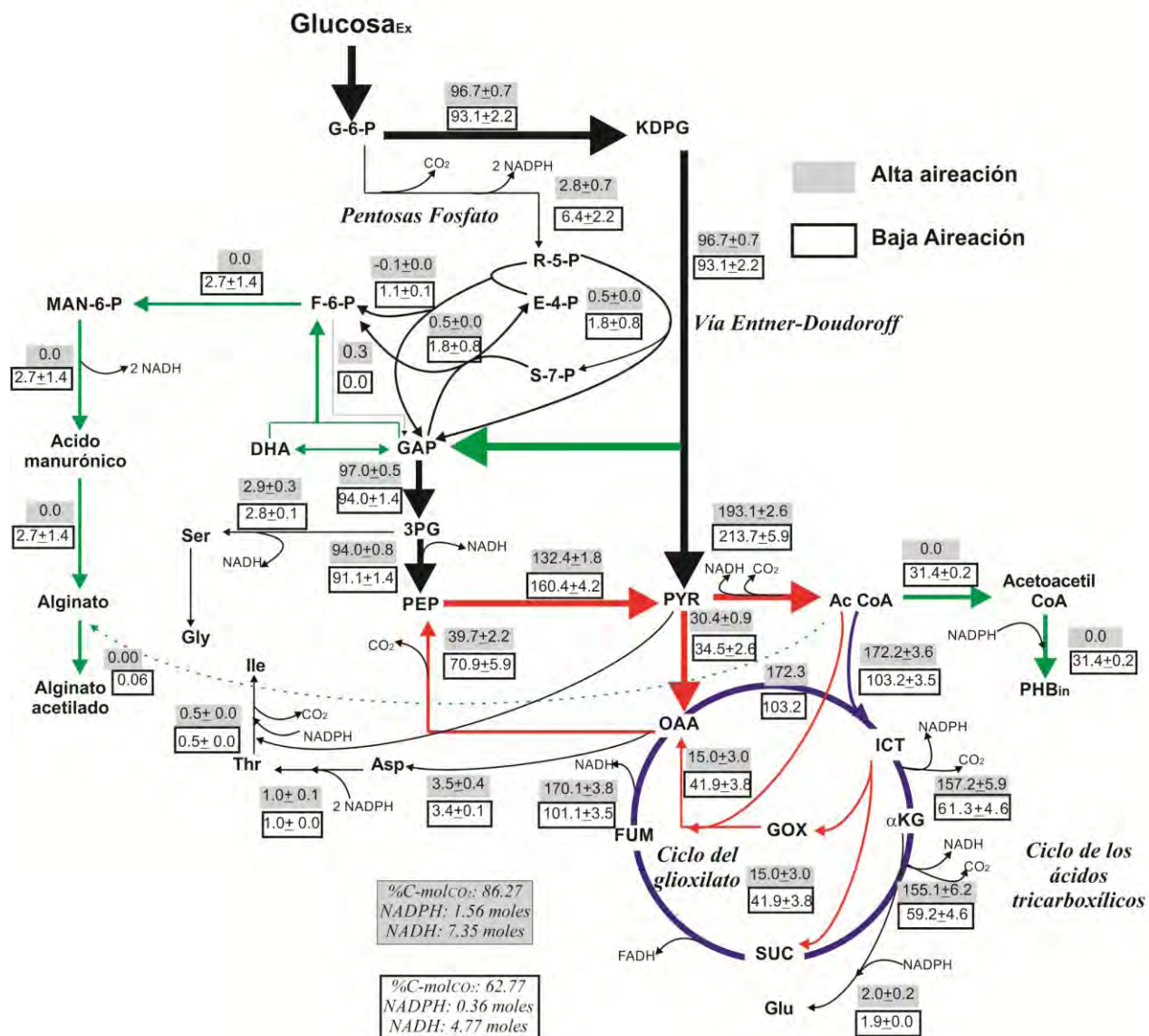
### 6.1.5. Análisis de flujo metabólico

Adicionalmente, la disponibilidad de oxígeno también tuvo un impacto importante en el flujo metabólico como se observa en la Figura 6.6. Las vías metabólicas en donde se observó un mayor impacto, debido a las diferencias en la disponibilidad de oxígeno, fueron: el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, los puntos de generación y regeneración de fosfoenol piruvato (PEP), piruvato (PYR) y acetil-CoA, así como el ciclo del glioxilato. Es importante mencionar que las diferencias observadas en el flujo metabólico podrían estar impactando respuestas como la acetilación del alginato y la producción de P3HB. A continuación se describen aquellas vías en donde se observó un mayor impacto en el flujo metabólico.

El metabolismo de la glucosa en *A. vinelandii*, se basa en la vía Entner-Doudoroff (Lynn y Sokatch, 1984; Beale y Foster, 1996), y con el análisis de flujo metabólico (AFM) fue posible confirmar que el flujo de carbono hacia esta vía es superior al 90 %, independientemente de la condición de aireación.

Además de la vía ED, se confirmó que la vía de las pentosas fosfato (PP) es una vía activa como previamente lo habían descrito Beale y Foster (1996). Sin embargo, el flujo de carbono hacia esta vía fue mayor, hasta 2.3 veces en los cultivos desarrollados en condiciones de baja disponibilidad de oxígeno, en comparación con los cultivos desarrollados en matraces bafleados. Esta vía provee a la célula de precursores metabólicos como la Ribulosa-5-P (R-5-P), así como de NADPH. La recirculación de carbono por esta vía se ha descrito en otros microorganismos como *Acetobacter*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Zymomonas* y *Rhizobium* entre otros, los cuales al igual que *A. vinelandii* metabolizan la glucosa por la vía ED y producen exopolisacáridos (Portais y Delort, 2002).

*A. vinelandii* es un organismo aerobio estricto (Setubal et al., 2009); siendo el ciclo de los ácidos tricarboxílicos la vía principal para la generación de poder reductor (NADH y FADH<sub>2</sub>), para la producción de ATP (Mailloux, et al. 2007), y esta fue una de las vías en donde se observó un mayor efecto de los cambios en la disponibilidad de oxígeno sobre el flujo de carbono. En esta vía se observó una disminución considerable en el flujo de carbono en las condiciones de baja disponibilidad de oxígeno (matraces convencionales) con respecto a los cultivos desarrollados en condiciones de alta disponibilidad de oxígeno (matraces bafleados); principalmente en los nodos comprendidos entre el oxaloacetato (OAA) e isocitrato (ICT) con una disminución en el flujo relativo del 40 %; del ICT hacia el  $\alpha$ -cetoglutarato ( $\alpha$ -KG) y del  $\alpha$ -KG al succinato (SUC) con un decremento en el flujo metabólico del 68 %, hacia ambos nodos. Cabe mencionar que estos



**Figura 6.6.** Mapa de flujo metabólico de *A. vinelandii* ATCC 9046 en  $[1-^{13}\text{C}]$  - glucosa bajo condiciones de baja y alta disponibilidad de oxígeno. Los flujos de carbono relativos (%-mol) se basaron en el consumo específico de glucosa (100%). La biomasa empleada para calcular el flujo metabólico fue:  $0.81 \pm 0.00 \text{ g}_{\text{CDW}}$  y  $0.95 \pm 0.03 \text{ g}_{\text{CDW}}$  para los cultivos en condiciones de baja disponibilidad de oxígeno;  $1.00 \pm 0.00 \text{ g}_{\text{CDW}}$  y  $1.52 \pm 0.00 \text{ g}_{\text{CDW}}$  para los cultivos en condiciones de alta disponibilidad de oxígeno. Los flujos metabólicos para alginato y PHB se calcularon con base en el peso molecular de los monómeros de ácido manurónico ( $194.4 \text{ g mol}^{-1}$ ) y el ácido 3-hidroxibutírico ( $104.1 \text{ g mol}^{-1}$ ) respectivamente. Los valores de flujo relativo representan el promedio de 100 iteraciones.



tres nodos son susceptibles de ser regulados negativamente por niveles de NADPH y/o NADH (Mailloux, et al. 2007). Finalmente el flujo relativo de carbono del fumarato (FUM) hacia el OAA disminuyó un 41 % en la condición de baja aireación. Cabe mencionar que la disminución en el flujo relativo hacia la vía de los ácidos tricarbóxicos en los cultivos desarrollados en los matraces convencionales tendrían un impacto importante sobre la producción neta ( $\text{mol mol}_G^{-1}$ ) de NADPH y NADH los cuales disminuirían hasta 76.9 y 35.1 % (Fig. 6.6), respectivamente, al compararse con los cultivos desarrollados en la condición de alta disponibilidad de oxígeno.

La segunda vía en donde se observaron diferencias importantes en el flujo de carbono entre las dos condiciones evaluadas, fueron los nodos de generación y regeneración de fosfoenol piruvato (PEP) y piruvato (PYR). El PYR es un nodo metabólico importante entre las reacciones para la generación de energía y la biosíntesis de otros compuestos metabólicos. En general, el flujo relativo de carbono hacia esta vía fue mayor en los cultivos desarrollados en condiciones de baja disponibilidad de oxígeno. Las reacciones involucradas en este ciclo comprenden la formación de PYR a partir del PEP, reacción catalizada por la enzima piruvato quinasa (PYK) con un incremento del 17.5 % en los cultivos en baja aireación. Posteriormente, en la reacción catalizada por la enzima piruvato deshidrogenasa, en la que el PYR es transformado en acetil-CoA el flujo relativo presentó un incremento de tan solo un 10 % en los cultivos en baja aireación. Finalmente, también hubo un incremento importante (43.9 %) en la reacción anaplerótica catalizada por la enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) que permite la regeneración de PEP a partir de OAA; esta enzima está involucrada en el reciclaje de PEP y PYR hacia OAA por la enzima piruvato carboxilasa (PYC); sin embargo, en este nodo el incremento en el flujo relativo de carbono fue solo de 11.8 % en la condición de baja aireación.

Finalmente, la tercera vía en la que se observaron diferencias importantes entre las dos condiciones de cultivo evaluadas fue el ciclo del glioxilato. En este ciclo anaplerótico tienen lugar dos reacciones enzimáticas. En la primera reacción, catalizada por la isocitrato liasa (ICL), el isocitrato se divide en SUC y glioxilato posteriormente la malato sintasa (MS) condensa el glioxilato y el acetil-CoA en malato. Este ciclo provee a las células de oxaloacetato (OAA), y su función en otros organismos como *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Corynebacterium glutamicum* se ha asociado al crecimiento con fuentes de carbono  $C_2$ , como el etanol, el acetato y ácidos grasos. En estas bacterias se ha observado que la expresión del gen *aceA*, que codifica para la ICL, se regula positivamente en presencia de acetato como fuente de carbono y que en presencia de glucosa, su expresión disminuye o no está presente (Kretchmar et al., 2008). Por otra parte, en *P. aeruginosa*, se ha observado que en cepas sobre-



productoras de alginato como la FRD1, la expresión del gen *aceA* es constitutiva en contraste con cepas no productoras de alginato (PAO1), en las que este gen y la actividad ICL se regulan positivamente en presencia de acetato y otras fuentes C<sub>2</sub> (Hagins et al.,2010). Sin embargo, en *A. vinelandii* este ciclo se encuentra activo aún cuando la fuente de carbono es glucosa, observándose un incremento del flujo relativo hacia esta ruta de 2.79 veces en condiciones de baja aireación en comparación con el flujo obtenido en los cultivos en alta aireación. Lo anterior sugiere que en *A. vinelandii*, en condiciones de baja disponibilidad de oxígeno, el ciclo del glioxilato es una vía alternativa para la reposición de (OAA), el cual puede también ser empleado para la regeneración de PYR y acetil-CoA.

Es importante resaltar que el comportamiento observado en los flujos relativos de carbono en los cultivos desarrollados en condiciones de baja aireación sustentan estudios previos relacionados con la síntesis de P3HB (Senior et al., 1972), en los que se propone que en condiciones de baja aireación, la acumulación de NADH y/o NADPH, inhiben alostéricamente algunas enzimas del ciclo de los ácidos tricarbóxicos, favoreciendo la desviación del acetil-CoA hacia la síntesis de P3HB (Senior et al., 1972).

Con el análisis de flujo metabólico fue posible comprobar que en condiciones de baja aireación el flujo de carbono hacia el ciclo de los ácidos tricarbóxicos disminuye, y que adicionalmente los flujos de carbono relacionados con la regeneración de acetil-CoA y sus precursores se incrementaron. Estas respuestas tuvieron un impacto importante no solo en la producción de P3HB el cual, como se describió previamente, sólo se sintetizó bajo condiciones de baja disponibilidad de oxígeno; sino que estos cambios también podrían estar impactando en el grado de acetilación del alginato debido a que el acetil-CoA es el donador de grupos acetilo para la acetilación del alginato (Franklin y Ohman, 2002). Como se describió previamente en condiciones de baja disponibilidad de oxígeno el grado de acetilación del alginato se incrementó 2.6 veces con respecto al grado de acetilación del alginato sintetizado en condiciones de mayor disponibilidad (Fig. 6.6).

En esta etapa fue posible demostrar que los cambios observados en la acetilación del alginato en cultivos bajo diferentes condiciones de disponibilidad de oxígeno están relacionados con cambios en el flujo de carbono hacia las principales vías metabólicas involucradas en el metabolismo de acetil-CoA (donador de grupos acetilo para la acetilación del alginato). Sin embargo, en este tipo de cultivos no fue posible definir el papel de la TOD y la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ); por lo que, en la siguiente etapa del estudio se emplearon

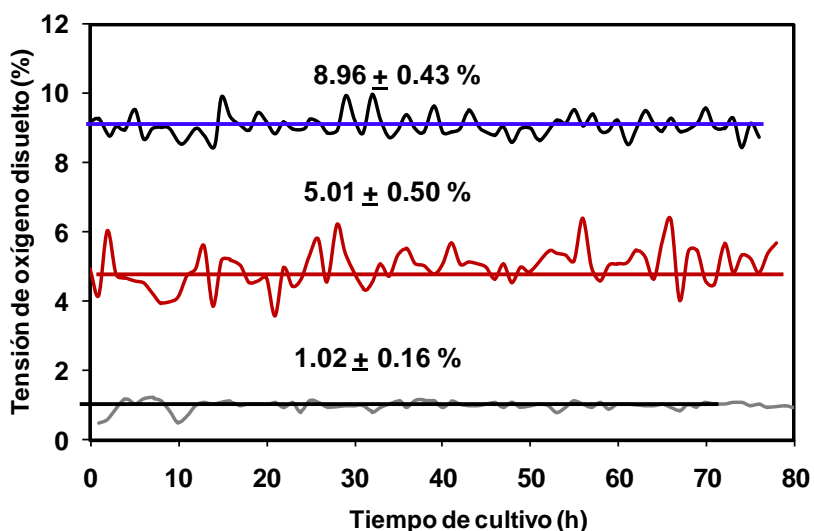
cultivos en condiciones controladas de TOD y  $\mu$  con la finalidad de identificar el efecto de estas variables sobre el grado de acetilación de los alginatos.

## 6.2. Estudio de la acetilación del alginato producido por *A. vinelandii* en condiciones controladas de TOD y velocidad específica de crecimiento

### 6.2.1. Intervalo de evaluación de TOD

Diversos autores han observado que la TOD y la  $\mu$  tienen un papel importante en el proceso de biosíntesis del alginato, afectando los rendimientos del polímero y su composición química, siendo el parámetro más estudiado el PMP del alginato (Lozano et al., 2011; Peña et al., 2000; Sabra et al., 1999; 2000; Priego-Jiménez et al., 2007). En estos estudios se observó que el principal efecto de la TOD sobre el PMP del alginato se observaba entre 1 y 10 % de TOD (Peña et al., 2000; Sabra et al., 2000). Por lo que en el presente estudio se evaluaron tres valores de TOD: 1, 5 y 9 %. En la Figura 6.7, se presenta el perfil de TOD característico para cada una de las condiciones evaluadas.

La evaluación del efecto de la tensión de oxígeno disuelto (TOD) y la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) se realizó en cultivos en quimiostato limitados por glucosa, en un intervalo de tasas de dilución ( $D$ ) de 0.02 a 0.15  $h^{-1}$ .



**Figura 6.7.** Perfiles de TOD característicos de los cultivos en quimiostato desarrollados a 1, 5 y 9 %

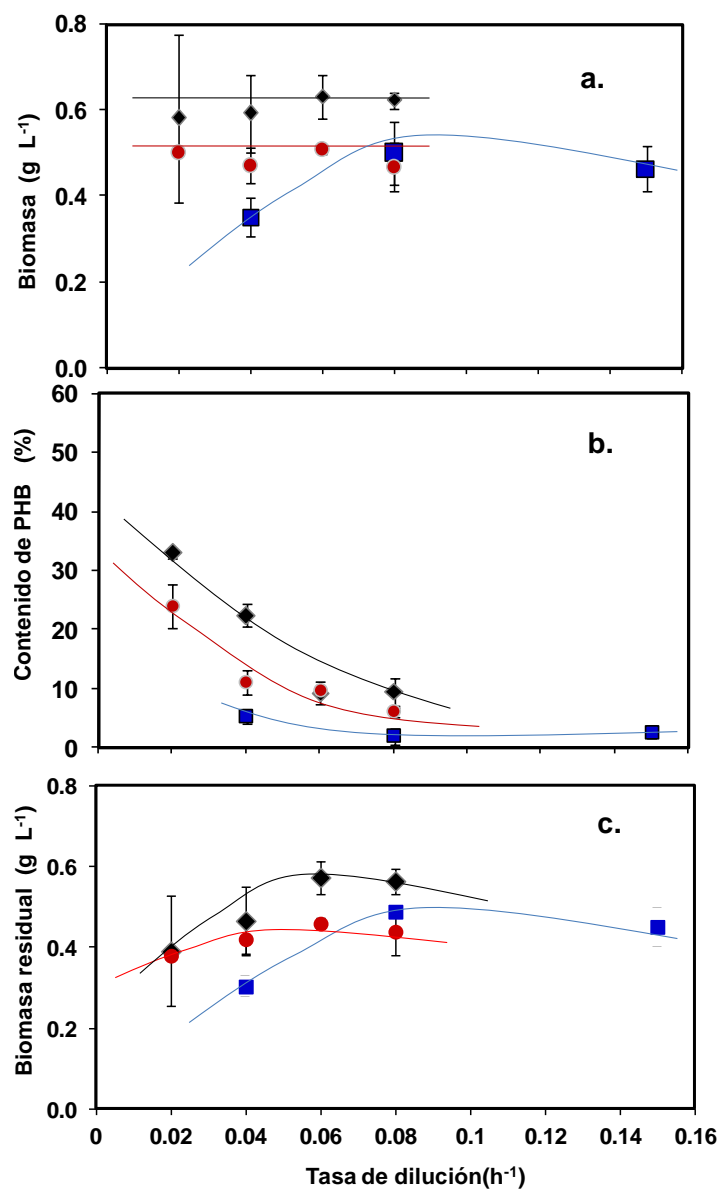
### 6.2.2. Crecimiento y producción de P3HB

En la Figura 6.8a se presentan los perfiles de concentración de biomasa en el estado estable. En general, los valores de concentración de biomasa fueron más altos en los cultivos desarrollados a 1 % de TOD independientemente de la D evaluada, obteniéndose una concentración promedio de  $0.61 \pm 0.02 \text{ g L}^{-1}$ . Observándose una disminución en los valores de concentración de biomasa conforme se incrementó la TOD, con valores de  $0.49 \pm 0.02 \text{ g L}^{-1}$  a 5 % de TOD y  $0.44 \pm 0.08 \text{ g L}^{-1}$  para 9% de TOD. Estas diferencias se deben principalmente a la acumulación de P3HB el cual, como se observa en la Figura 6.8b, en los cultivos a 1 % de TOD representó entre el 9 y el 33 % del peso seco para valores de D de 0.08 y  $0.02 \text{ h}^{-1}$ , respectivamente; en contraste en los cultivos a 9 % de TOD la acumulación de P3HB no fue mayor al 5 % del peso seco, en cualquiera de las D evaluadas.

Como se describió previamente, ha sido ampliamente documentado que en las especies de *Azotobacter*, el P3HB se acumula preferencialmente bajo condiciones de limitación de oxígeno (Peña et al., 2011a) y a bajas velocidades de crecimiento (Senior et al., 1972; Hernández-Eligio et al., 2011); debido entre otros factores, a procesos de regulación enzimática por la relación de cofactores como el NADPH/NADP y acetil-CoA/CoA (Senior et al., 1972), así como por la regulación a nivel transcripcional de los genes *phbBAC*, dependientes del factor transcripcional global RpoS (Hernández-Eligio et al., 2011).

En lo que se refiere a la tendencia de la biomasa residual, definida como la diferencia entre la biomasa y el P3HB (Heinzle y Lafferty, 1980), en las tres condiciones de TOD se observa una disminución de la concentración de biomasa residual a bajas D (Fig. 6.8c). Dicho comportamiento es característico de los cultivos en quimiostato limitados por carbono y esta disminución está asociada al consumo energético empleado para el mantenimiento celular (Quintero, 1981). Es importante resaltar que en lo que se refiere a la concentración de biomasa residual, no se observaron diferencias (a bajas D) entre los cultivos a 1 y 5 % de TOD. En contraste, en los cultivos a 9 % de TOD las concentración de biomasa residual a  $D = 0.04 \text{ h}^{-1}$  son inferiores (30 %) con respecto a la concentración de biomasa residual obtenida a esa D en los cultivos a 1 y 5 % de TOD. Estas diferencias podrían estar relacionadas con otra característica importante de *A. vinelandii*, su capacidad para fijar nitrógeno aún en presencia de altas concentraciones de oxígeno, debido a que posee mecanismos que le permiten proteger el sistema nitrogenasa (Oelze, 2000). Entre los mecanismos propuestos para la protección del sistema nitrogenasa se encuentra el denominado "protección respiratoria", el cual consiste en la regulación del consumo de oxígeno para mantener bajas las concentraciones de oxígeno en el

citoplasma. Sin embargo, este mecanismo de protección implica un elevado consumo energético y, por lo tanto bajos rendimientos de biomasa.



**Figura 6.8.** Concentración de biomasa total en los cultivos en quimiostato desarrollados a 1 (♦), 5 (●) y 9% (■) (a); contenido de P3HB (p/p %) en los cultivos a 1 (♦), 5 (●) y 9% (■) de TOD (b); concentración de biomasa residual (biomasa - PHB) a 1 (♦), 5 (●) y 9% (■) (c).

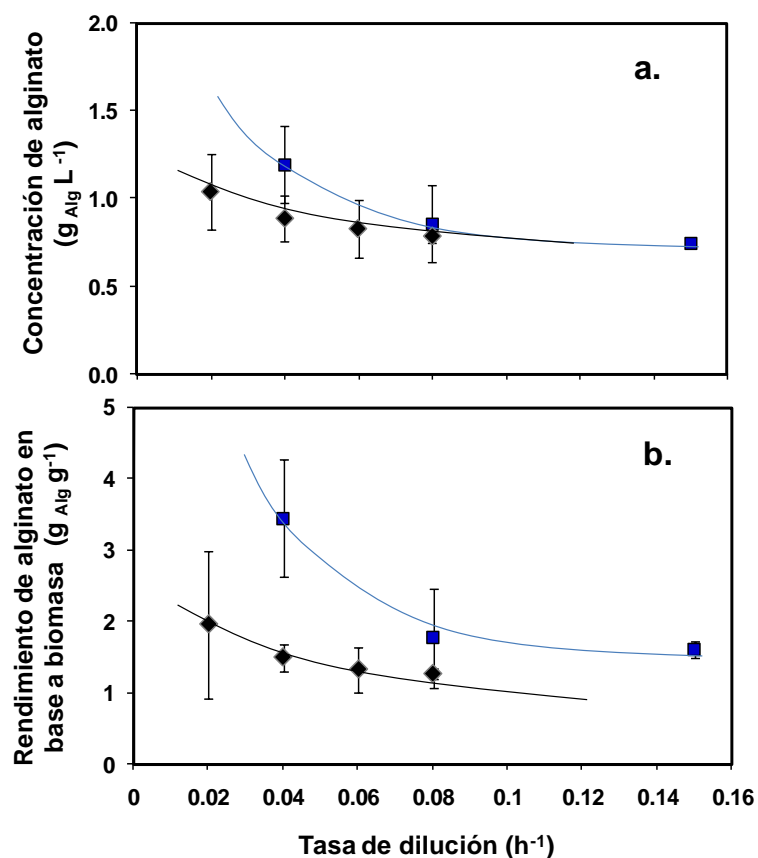
### 6.2.3. Producción de alginato en función de la TOD y la velocidad específica de crecimiento: concentración, rendimientos y peso molecular promedio

En la Tabla 6.2 se presentan los valores de la concentración, los rendimientos y el peso molecular promedio de los alginatos obtenidos en los cultivos en quimiostato de *A. vinelandii*. Se debe enfatizar que en estos parámetros, así como en el grado de acetilación del alginato, no se observaron diferencias significativas ( $p>0.05$ ) entre los cultivos a 1 y 5 % de TOD, independientemente de la tasa de dilución, por lo que los resultados y discusión se centrarán en los cultivos a 1 y 9 % de TOD (Fig. 6.9).

**Tabla 6.2.** Concentración promedio, rendimientos y peso molecular promedio del alginato a 1, 5 y 9 % de TOD. Los valores en paréntesis se calcularon con base en la biomasa residual (biomasa-PHB)

TOD (%)	D (h <sup>-1</sup> )	Alginato (g L <sup>-1</sup> )	Y <sub>Alg/X</sub> (g <sub>Alg</sub> g <sub>G</sub> <sup>-1</sup> )	Y <sub>Alg/G</sub> (g <sub>Alg</sub> g <sup>-1</sup> )	PMP (KDa)
1	0.02	1.04±0.22	1.96±1.03 (2.93±1.58)	0.26±0.05	1140±270
	0.04	0.89±0.13	1.49±0.19 (1.93±0.29)	0.22±0.03	1286±510
	0.06	0.86±0.16	1.32±0.32 (1.45±0.32)	0.21±0.04	830±272
	0.08	0.79±0.04	1.26±0.08 (1.40±0.11)	0.20±0.01	1009±215
5	0.02	0.97	1.90 (2.55)	0.24	1903
	0.04	0.77±0.15	1.66±0.45 (1.86±0.46)	0.19±0.04	552±137
	0.06	0.65±0.13	1.28±0.23 (1.41±0.24)	0.16±0.03	1293±490
	0.08	0.64±0.18	1.41±0.53 (1.51±0.57)	0.17±0.06	1418±448
9	0.04	1.19±0.22	3.44±0.82 (3.90±1.11)	0.30±0.06	761±195
	0.08	0.86±0.22	1.77±0.70 (1.79±0.69)	0.22±0.05	1385±316
	0.15	0.74±0.04	1.61±0.12 (1.66±0.14)	0.19±0.01	819±274

En el caso de la producción volumétrica de alginato no se observaron diferencias significativas en los valores de concentración de alginato en el estado estable entre las diferentes condiciones de cultivo evaluadas (Fig. 6.9a), con un valor promedio de  $(0.84 \pm 0.17 \text{ g L}^{-1})$ . Es importante resaltar que los rendimientos de alginato en base a biomasa ( $Y_{\text{alg/x}}$ ), en todos los casos fueron superiores en comparación con aquellos reportados previamente por otros autores para cultivos en lote y quimiostato (Peña et al., 2000; Sabra et al., 2000; Díaz-Barrera et al., 2010) alcanzando valores que oscilaron entre  $1.3 \pm 0.32 \text{ g}_{\text{Alg}} \text{ g}^{-1}$  y  $3.4 \pm 0.82 \text{ g}_{\text{Alg}} \text{ g}^{-1}$ , obteniéndose este último valor en la condición de 9 % de TOD y  $0.04 \text{ h}^{-1}$  (Fig. 6.9b).



**Figura 6.9.** Concentración de alginato en cultivos en quimiostato desarrollados a 1 (◆) y 9 % (■) de TOD (a); rendimientos de alginato con base en biomasa ( $Y_{\text{Alg/x}}$ ) en cultivos en quimiostato desarrollados a 1 (◆) y 9 % (■) de TOD (b).

En lo que se refiere al PMP del alginato (Tabla 6.2), no se observaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre las diferentes condiciones evaluadas, con un valor promedio de  $1033.40 \pm 245.19$

KDa. Este comportamiento contrasta con lo descrito previamente por otros autores (Peña et al., 2000; Trujillo-Roldán et al., 2004; Flores et al., 2013; Sabra et al., 2000; Díaz-Barrera et al., 2010), quienes observaron un efecto importante tanto de la TOD como de la velocidad específica de crecimiento sobre el PMP del alginato. Sin embargo, otros autores como Lozano et al. (2011) y Díaz-Barrera et al. (2007; 2011), han propuesto que es la velocidad de transferencia de oxígeno (VTO), independientemente de la TOD, la variable que podría afectar el proceso de polimerización del alginato. En este sentido, se ha reportado que en los cultivos de *A. vinelandii* desarrollados en condiciones de bajas VTOs (2 - 6 mmol L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> en cultivos sin control de TOD y de 20 - 40 mmol L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> en cultivos con control de TOD) se obtienen alginatos de alto PMP, con valores superiores a 500 KDa (Díaz-Barrera et al., 2007; 2011; Lozano et al., 2011). En el presente estudio los valores de VTO (VCO) (Tabla 6.3), oscilaron dentro de este intervalo (2 - 40 mmol L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>), lo que podría sugerir que en las condiciones de cultivo evaluadas (cultivos diazotróficos en quimiostato) la VTO tuvo un efecto importante sobre el PMP del alginato, independientemente de las condiciones de TOD o D. Sin embargo, se debe resaltar que hasta el momento no es posible dar una explicación completa con respecto al comportamiento observado en relación al PMP de alginato bajo las condiciones de cultivo estudiadas.

**Tabla 6.3.** Velocidad de consumo de oxígeno, velocidad específica de consumo de oxígeno y coeficiente respiratorio en los cultivos a 1 y 9 % de TOD.

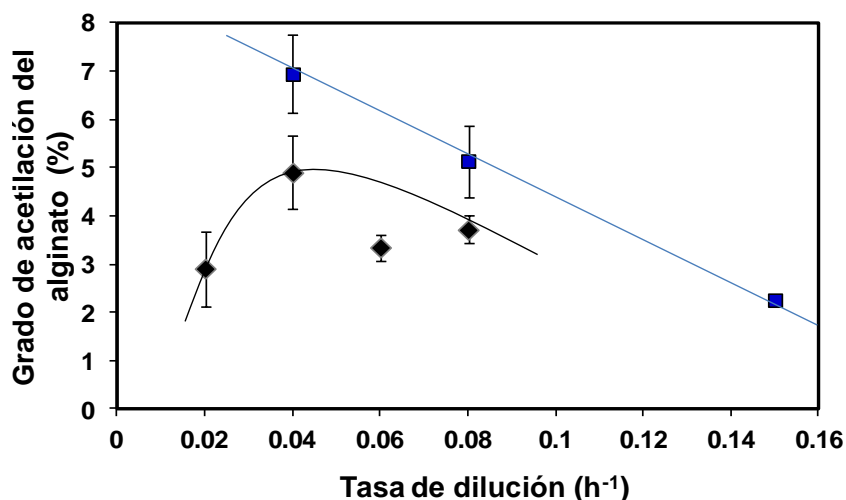
TOD (%)	D (h <sup>-1</sup> )	VCO (mmol L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	q <sub>o2</sub> (mmol g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	RQ (-)
1	0.02	2.90	4.00	0.57
	0.04	5.46±0.40	8.50±1.40	0.61
	0.06	7.82±0.29	12.20±1.70	0.63
	0.08	13.38±2.70	21.60±5.00	0.50
9	0.04	6.97±1.09	21.70±4.60	0.47
	0.08	10.71±1.04	21.50±1.00	0.65
	0.15	18.36±2.60	39.70±5.00	0.79

#### 6.2.4. Grado de acetilación del alginato en función de la TOD

En contraste con los resultados obtenidos en los cultivos en matraces agitados y lo reportado previamente por otros autores en cultivos en matraces (Peña et al., 2011b), el grado de

acetilación del alginato fue significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) en aquellos cultivos expuestos a una elevada TOD (9 %), con respecto al grado de acetilación de los alginatos obtenido en cultivos a 1 % de TOD. Sin embargo, este comportamiento sólo se observó dentro de un intervalo de  $\mu$  entre 0.04 y 0.08  $\text{h}^{-1}$  (Fig. 6.10).

Se ha propuesto que el acetil-CoA es el donador de grupos acetilo para la acetilación del alginato (Clarke et al., 2000; Franklin y Ohman, 2002) y además es el precursor de la biosíntesis de P3HB (Senior et al., 1972). En condiciones de limitación de oxígeno, como las descritas en los cultivos en matraces con baja aireación, se ha propuesto que la reducción del flujo de acetil-CoA hacia el ciclo de los ácidos tricarbóxicos incrementa la disponibilidad de acetil-CoA, para la acetilación del alginato (Peña et al., 2011b) y la producción de P3HB (Senior et al., 1972).



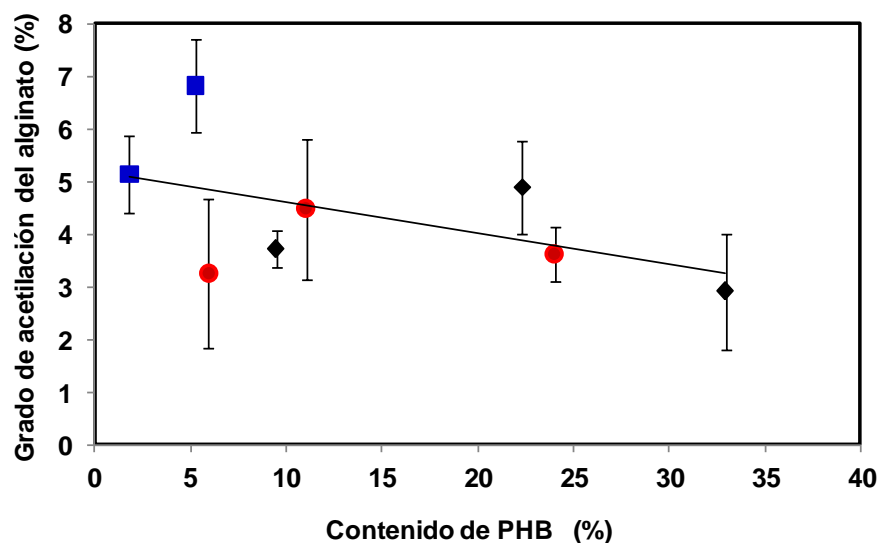
**Figura 6.10.** Grado de acetilación del alginato en cultivos en quimiostato desarrollados a 1 (◆) y 9 % (■) de TOD.

En el caso de los cultivos en quimiostato desarrollados a 9 %, para un intervalo de  $\mu$  entre 0.04 y 0.08  $\text{h}^{-1}$ , también se observa una disminución en la velocidad específica de consumo de oxígeno ( $q_{O_2}$ ), así como en los valores de RQ, ambos parámetros se presentan en la Tabla 6.3; sugiriendo que a pesar de que no existe una limitación de oxígeno si hay una reducción en el flujo de carbono hacia el ciclo de los ácidos tricarbóxicos, incrementando la disponibilidad de acetil-CoA.

Otra característica importante de los cultivos a 9 % de TOD es que en comparación con los cultivos desarrollados a 1 % de TOD en el mismo intervalo de  $\mu$ , la acumulación de P3HB fue



despreciable, y como se observa en la Figura 6.11 existe una relación inversa entre la producción de P3HB y el grado de acetilación del alginato.



**Figura 6.11.** Relación del grado de acetilación del alginato y la concentración de P3HB en cultivos en quimiostato desarrollados a 1 (♦), 5 (●) y 9 % (■) de TOD.

En la Tabla 6.4 se presenta la distribución de carbono (% C-mol), entre ambas condiciones de TOD. En esta se observa, que en los cultivos desarrollados a 1 % de TOD y 0.04 h<sup>-1</sup> el % C-mol destinado a la síntesis de P3HB (3.8 %) fue mayor en comparación con % C-mol empleado para la acetilación del alginato el cual fue de tan solo 1.5 %. En contraste, en los cultivos a 9 % de TOD el % C-mol empleado para la biosíntesis de P3HB fue despreciable (0.3 - 0.5 %); siendo 2.8 el % C-mol destinado a la acetilación del alginato.

**Tabla 6.4.** Distribución de carbono. Para calcular el % C-mol se realizaron las siguientes consideraciones: 24.6 g<sub>CDW</sub> = 1C-mol para % C-mol<sub>biomasa</sub>; 26.0 g Ácido hidroxibutírico = 1C-mol para % C-mol<sub>P3HB</sub>; 32.3 g Manurónico = 1C-mol para % C-mol<sub>Alg</sub>; 21.5 g Acetil = 1C-mol para % C-mol<sub>Acetil</sub>.

TOD (%)	D (h <sup>-1</sup> )	% C <sub>Alg</sub> -mol	% C <sub>Ace</sub> -mol	% C <sub>Bio</sub> -mol	% C <sub>P3HB</sub> -mol	% C <sub>CO2</sub>
1	0.04	19.5	1.5	14.2	3.8	61.1
	0.08	17.6	1.0	17.2	1.7	62.5
	0.04	25.7	2.8	9.3	0.5	61.8
9	0.08	18.8	1.5	14.9	0.3	64.5

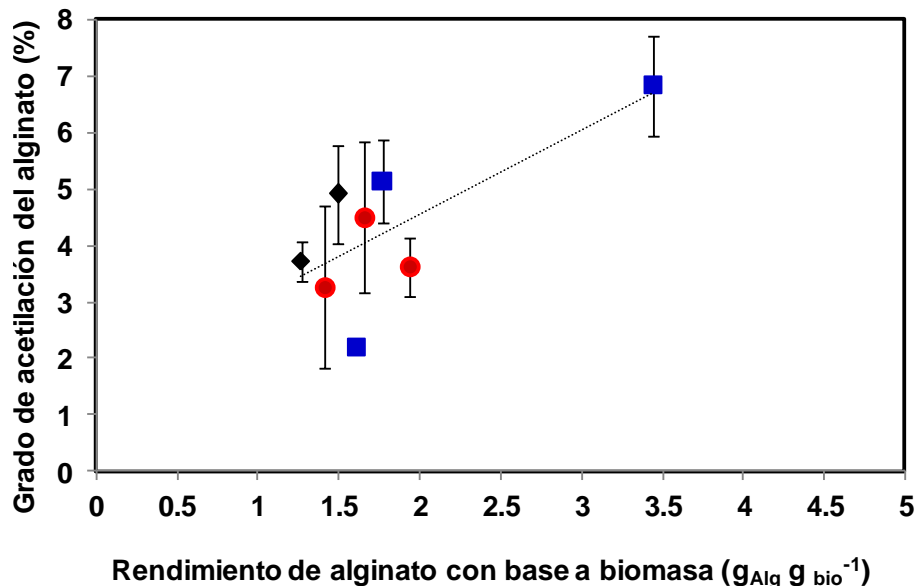
Otra característica importante de los cultivos desarrollados a 9 % de TOD y bajas  $\mu$ , principalmente  $0.04 \text{ h}^{-1}$ , fue que bajo estas condiciones de cultivo los rendimientos de alginato con respecto a la biomasa fueron los más altos (Fig. 6.9). Con base en lo anterior es posible proponer que bajo estas condiciones de cultivo, se favorece todo el proceso de biosíntesis del alginato, no sólo la acetilación.

A pesar de que el efecto de la TOD sobre la producción del alginato ha sido estudiada por diversos autores (Lozano et al., 2011, Peña et al., 2000, Sabra et al., 1999, 2000), la regulación de la biosíntesis de este producto es compleja por lo que se desconocen las respuestas fisiológicas que pueden ser afectadas positivamente por la TOD; sin embargo en *P. aeruginosa*, Leitao y Sá-Correia (1997) observaron que la expresión de los genes *algA*, *algC* y *algD*, así como las actividades de las enzimas que codifican, se regulaban positivamente al incrementarse la TOD (1 - 10 %).

#### **6.2.5. Grado de acetilación del alginato en función de la velocidad específica de crecimiento**

Es importante resaltar que el grado de acetilación del alginato no sólo se vio afectado por la TOD. En la Figura 6.10 se observa el efecto de la  $\mu$  sobre esta variable. Para las dos condiciones de TOD evaluadas, los valores más altos de grado de acetilación ( $p < 0.05$ ) se obtuvieron a bajas  $\mu$  ( $0.04 \text{ h}^{-1}$ ). Adicionalmente, los rendimientos de alginato ( $Y_{\text{alg}/X}$ ) presentaron un comportamiento similar, al obtenerse los valores más altos de este parámetro conforme la velocidad específica de crecimiento disminuyó (Fig. 6.9b). Observándose una correlación entre el grado de acetilación y los rendimientos de alginato (Fig. 6.12.). Este comportamiento sugiere que existe una estrecha relación entre el proceso de biosíntesis y el proceso de acetilación del alginato.

En estudios previos, Sengha et al. (1989) en cultivos en quimiostato de *Pseudomonas mendocina*, y Priego-Jiménez et al. (2005) en cultivos exponencialmente alimentados de la cepa mutante SML2 de *A. vinelandii* observaron un incremento en los rendimientos alginato a bajas  $\mu$ . Por lo que, los resultados obtenidos en el presente trabajo confirman que a bajas velocidades específicas de crecimiento, la fuente de carbono se dirige de forma importante hacia la formación del alginato (Tabla 6.4). Este comportamiento podría estar relacionado con las funciones biológicas del alginato: la formación de quistes en *A. vinelandii* y biopelículas en *Pseudomonas*. En donde, ambos procesos se caracterizan por presentarse en condiciones de limitación nutricional y a bajas velocidades específicas de crecimiento.



**Figura 6.12.** Relación del grado de acetilación del alginato y el rendimiento de alginato ( $Y_{Alg/x}$ ) en cultivos en quimiostato desarrollados a 1 (♦), 5 (●) y 9 % (■) de TOD.

En síntesis, a partir de los resultados obtenidos en esta etapa del estudio, se demostró que en cultivos en quimiostato de *A. vinelandii*, la TOD y la  $\mu$  determinan el grado de acetilación de los alginatos. Debido entre otros factores, al efecto que estas variables tienen sobre procesos como la biosíntesis de alginato y P3HB, los cuales podrían afectar (directa o indirectamente) el proceso de acetilación de los alginatos.

## 7. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo se demostró que:

- En cultivos diazotróficos los cambios en la disponibilidad de oxígeno, aún en condiciones no controladas de TOD y  $\mu$ , tienen un efecto importante en los flujos metabólicos de *A. vinelandii*, principalmente en aquellos relacionados con: el TCA, las vías de síntesis de acetil-CoA y sus precursores, así como con el ciclo del glioxilato.
  - En el caso de los cultivos en condiciones de baja disponibilidad de oxígeno, el flujo de carbono hacia el TCA disminuyó, en comparación con los flujos de carbono observados en la condición de alta aireación.
  - En contraste, en las condiciones de baja disponibilidad de oxígeno se incrementó el flujo de carbono hacia los puntos de generación de acetil-CoA y sus precursores, así como hacia el ciclo del glioxilato.
  - Estas respuestas a nivel de flujo metabólico, relacionadas con la disponibilidad de acetil-CoA, tienen un impacto importante en el grado de acetilación del alginato el cual fue mayor en la condición de baja disponibilidad de oxígeno.
- En cultivos en quimiostato limitados por glucosa bajo condiciones de diazotrofia, la TOD y la  $\mu$  determinan el grado de acetilación de los alginatos sintetizados por *A. vinelandii*. El incremento de la TOD afecta positivamente el grado de acetilación del alginato; en contraste, el grado de acetilación del alginato se incrementa conforme la  $\mu$  disminuye. Por lo que, el valor más alto del grado de acetilación del alginato se obtuvo en los cultivos desarrollados a 9 % de TOD y  $\mu = 0.04 \text{ h}^{-1}$ .
- La TOD y la  $\mu$  tienen un impacto importante sobre la síntesis de alginato y PHB, así como, sobre la velocidad específica de consumo de oxígeno; estas tres respuestas fisiológicas afectan indirectamente el grado de acetilación del alginato. El grado de acetilación del alginato presenta una relación inversa con respecto a la concentración de PHB y la velocidad específica de consumo de oxígeno, sin embargo, es directamente proporcional a la síntesis de alginato.
- La acetilación del alginato depende de la disponibilidad de acetil-CoA y está estrechamente relacionada con el proceso de biosíntesis del alginato.

## **8. APORTACIONES Y PERSPECTIVAS**

### **8.1. APORTACIONES**

Las principales aportaciones de este estudio fueron:

- Se realizó por primera vez el análisis de flujo metabólico en *A. vinelandii* bajo dos condiciones de aireación, con lo que fue posible:
  - Identificar las principales vías involucradas en el metabolismo del acetil-CoA en *A. vinelandii*.
  - Evaluar el efecto de las condiciones de aireación sobre los flujos de carbono relacionados con el metabolismo del acetil-CoA y su impacto sobre el grado de acetilación de los alginatos.
  - El conocimiento generado en el presente estudio, permite plantear el desarrollo de mutantes específicas de *A. vinelandii*, para evaluar los cambios que se ocasionan manipulado las vías metabólicas que permiten generar acetil-CoA y precursores metabólicos de los alginatos, así como para la obtención de alginatos con características químicas definidas.
- Se estudió por primera vez en cultivos en quimiostato, el efecto de la TOD y la  $\mu$  sobre el grado de acetilación de los alginatos, con lo que fue posible establecer el papel de estas variables y su impacto sobre algunas respuestas fisiológicas involucradas en el proceso de acetilación del alginato.
  - Este conocimiento permitirá el desarrollo de estrategias de cultivo para la producción de alginato con características químicas definidas.

### **8.2. PERSPECTIVAS**

- En aquellas condiciones de cultivo en las que se identificaron diferencias importantes en el grado de acetilación del alginato, se propone evaluar el efecto de estas condiciones sobre la expresión de los genes que codifican para las proteínas AlgI, AlgV y AlgF, con la finalidad de identificar si existe correlación entre la expresión y el grado de acetilación.
- Adicionalmente, se propone el estudio del comportamiento de una cepa mutante no productora de P3HB bajo estas condiciones de cultivo para comprobar la competencia

que podría existir entre el proceso de biosíntesis de P3HB y el proceso de acetilación del alginato por el acetyl-CoA.

- Aún cuando en la etapa de cultivos en quimiostato fue posible identificar el papel de la TOD y la  $\mu$ , sobre la acetilación del alginato, estos resultados se limitan a condiciones diazotróficas; por lo que, en estudios futuros sería interesante evaluar si los mecanismos aquí descritos se conservan en condiciones de no fijación de nitrógeno.

## 9. REFERENCIAS

- Annison G., Couperwhite I. (1986) Influence of calcium on alginate production and composition in continuous cultures of *Azotobacter vinelandii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 25: 55-61.
- Augst A., Joon-Kong H., Mooney D. (2006) Alginate hydrogels as biomaterials. *Macromolecular Bioscience*. 6: 623-633.
- Beale J.M., Foster J. L. (1996) Carbohydrate fluxes into alginate biosynthesis in *Azotobacter vinelandii* NCIB 8789: NMR Investigations of the triose pools. *Biochemistry*. 35: 4492-4501.
- Bertsova Y. V., Bogachev A. V., Spulachev V. P. (2001) Non coupled NADH: ubiquinone oxidoreductase of *Azotobacter vinelandii* is required for diazotrophic growth at high oxygen concentrations. *Journal of Bacteriology*. 183 (23): 6869-6874.
- Büchs J., Maier U., Milbradt C., Zoels B. (2000) Power consumption in shaking flasks on rotary shaking machines: I. Powerconsumption measurement in unbaffled flasks at low liquid viscosity. *Biotechnology and Bioengineering*. 68(6): 589-593
- Büchs J. (2001) Introduction to advantages and problems of shaken cultures. *Biochemical Engineering Journal*. 7:91-98.
- Castañeda M., Sánchez J., Moreno S., Núñez C., Espín G. (2001) The global regulators GacA and  $\sigma^S$  form part of a cascade that controls alginate production in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*. 183(23):6787-96793
- Castillo T., Galindo E., Peña C. (2013a). The acetylation degree of alginates in *Azotobacter vinelandii* ATCC9046 is determined by dissolved oxygen and specific growth rate: studies in glucose-limited chemostat cultivations. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 40(7): 715-723
- Castillo T., Heinzle E., Peifer S., Schneider K. Peña C. (2013b) Oxygen supply strongly influences metabolic fluxes, production of poly(3-hydroxybutyrate) and alginate, as well as the degree of acetylation of alginate in *Azotobacter vinelandii*. *Process Biochemistry*. 48(7): 995-1003

- Cárdenas A. (1997) Reología y asociación molecular en solución en poliuronatos de origen diverso. Tesis de maestría, CIAD. Hermosillo, Sonora.
- Cheetman N. W. H., Punruckvong. (1985) An HPLC method for the determination of acetyl and pyruvyl groups in polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*. 5: 399-406.
- Clarke A.J., Strating H., Blackburne N. T. (2000) Pathways for the O-acetylation of bacterial cell wall polysaccharides. In: *Glycobiology*. Ed. Ron J. Doyle. DOI 10.1007/b113570.
- Clementi F. (1997) Alginate production by *Azotobacter vinelandii*. *Critical Reviews in Biotechnology*. 17 (4):327-361.
- Covarrubias S. A., de-Bashan L. E., Moreno M., Bashan Y. (2012) Alginate beads provide a beneficial physical barrier against native microorganisms in wastewater treated with immobilized bacteria and microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 93:2669-2680.
- Curatti L., Brown C.S., Ludden P.W., Rubio L.M. (2005) Genes required for rapid expression of nitrogenase activity in *Azotobacter vinelandii*. *PNAS*. 102(18):6291-6296.
- Cyril P.P., Suzuki Y., Rachinskiy K., Lotter S., Büchs J. (2006) Volumetric power consumption in baffled flasks. *Chemical Engineering Science*. 61:3771-3779.
- Delis V, (2009), Physiological studies and metabolic flux analysis of *Corynebacterium glutamicus* mutant strains. Master Thesis, Saarland University.
- Díaz-Barrera A., Peña C. and Galindo E. (2007) The oxygen transfer rate influences the molecular mass of the alginate produced by *Azotobacter vinelandii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*.76:903-910.
- Díaz-Barrera A, Silva P, Berrios J and Acevedo F (2010) Manipulating the molecular weight of alginate produced by *Azotobacter vinelandii* in continuous cultures. *Bioresource Technology* 101: 9405-9408.
- Díaz-Barrera A., Aguirre A. Berrios J., and Acevedo F. (2011) Continuous cultures for alginate production by *Azotobacter vinelandii* growing at different oxygen uptake rates. *Process Biochemistry*. 46:1879-1883.



- Díaz-Barrera A, Soto E and Altamirano C (2012) Alginate production and *alg8* gene expression by *Azotobacter vinelandii* in continuous cultures. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 39: 613-621.
- Draget, I. and Taylor, C. (2011). Chemical, physical and biological properties of alginates and their biomedical implications *Food Hydrocolloids*, 25: 251-256.
- Fischer E. and Sauer U. (2003) A novel metabolic cycle catalyzes glucose oxidation and anaplerosis in hungry *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 278 (47): 46446-46451.
- Flores C., Moreno S., Peña C., Galindo E. (2013) Expression of alginases and alginate polymerase genes in response to oxygen, and their relationship with the alginate molecular weight in *Azotobacter vinelandii*. *Enzyme and Microbial Technology*. 53: 85-91.
- Franklin M. J. and Ohman D. E. (2002) Mutant analysis and cellular localization of the Alg I, Alg J and Alg F proteins required for O acetylation of alginate in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*. 184 (11): 3000-3007.
- Franklin M J, Douthit S A and McClure M A. Evidence that the *algI/algJ* gene cassette, required for O-acetylation of *Pseudomonas aeruginosa* alginate, evolved by lateral gene transfer. *Journal of Bacteriology* 2004; 186 (14): 4759-4773.
- Franklin M.J., Nivens D.E., Weadge J.T. and Howell L. (2011) Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* extracellular polysaccharides, alginate, Pel and Psl. *Frontiers in microbiology*. Doi: 10.3389/fmicb.2011.00167
- Gacesa P. (1988) Alginates. *Carbohydrate polymers*.8:161-182.
- Galindo E., Peña C., Núñez C., Segura D. and Espín G. (2007) Molecular and bioengineering strategies to improve alginate and polyhydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii*. *Microbial Cell Factories*, 6 (7).
- Gimmestad, M., Ertesvag, H., Heggeset, T., Aarstad O., Svanem, B., Valla, S. (2009). Characterization of three new *Azotobacter vinelandii* alginate lyases, one of which is involved in cyst germination. *Journal of Bacteriology*. 191, 4845-4853

- Hagins J. M., Scofield J. A., Suh S.-J., Silo-Suh L. (2010) Influence of RpoN on isocitrate lyase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 156:1201-1210
- Hamidi M. Azadi A. and Rafiel P. (2008). Hydrogel nanoparticles in drug delivery, *Advanced drug delivery reviews*. 60 : 1638-1649.
- Hay I.D., Rehman Z. U., Ghafoor A. y Rehm B.H.A. (2010) Bacterial biosynthesis of alginates. *Society of chemical industry*. Doi:10.1002/jctb.2372
- Hernández-Eligio A, Castellanos M, Moreno S and Espin G (2011) Transcriptional activation of the *Azotobacter vinelandii* polyhydroxybutyrate biosynthetic genes *phbBAC* by PhbR and RpoS. *Microbiology*. 157: 3014-3023.
- Igarashi R.Y., Dos Santos P., Niehaus w.G. Dance I.G., Dean D.R. and Seefeldt L.C. (2004) localization of a catalytic intermediate bound to the FeMO-cofactor of nitrogenase. *The Journal of Biological Chemistry*. 279(33): 34770-34775.
- Klöeckner W., and Büchs J. (2012). Advances in shaking technologies. *Trends in Biotechnology*. 30(6): 307-314.
- Knutson C and Jeanes A. (1967) A new modification of carbazole analysis: applications to heteropolysaccharides. *Annals of Biochemistry*. 24: 470-481
- Kretzschmar U, Khodaverdi V, Jeoung J-H and Görisch H. (2008) Function and transcriptional regulation of isocitrate lyase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Archives of Microbiology* 190:151-158.
- Leitao J H and Sá- Correia I (1997) Oxygen-dependent upregulation of transcription of alginate genes *algA*, *algC* and *algD* in *Pseudomonas aeruginosa*. *Research Microbiology* 148: 37-43.
- Lozano E, Galindo E and Peña C (2011) Oxygen transfer rate during the production of alginate by *Azotobacter vinelandii* under oxygen-limited and non oxygen-limited conditions. *Microbial Cell Factories* 10 (13).

- Lynn A., Sokatch J. R (1984) Notes: Incorporation of isotope from specifically labeled glucose into alginates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Azotobacter vinelandii*, 158 (3): 1161-1162.
- Maier U., Büchs J. (2001). Characterisation of the gas-liquid mass transfer in shaking bioreactors. *Biochemical Engineering* 7: 99-106
- Mailloux R. J., Berlault R., Lomire J., Singh R., Cheniet D. R., Hamel R. D., Appanna V. D. (2007) The tricarboxylic acid cycle, an ancient metabolic network with a novel twist. *PLoS ONE*; 2(8). doi:10.1371/journal.pone.0000690
- Mejía-Ruiz H., Guzmán J., Moreno S., Soberón-Chávez G., Espín G. (1997) The *Azotobacter vinelandii* *alg8* y *alg44* genes are essential for alginate synthesis and can be transcribed from an *algD*-independent promoter. *Gene*.199:271-277.
- Muhammadi, Ahmed N. ( 2007) Genetics of bacterial alginate: alginate genes distribution, organization and biosynthesis in bacteria. *Current Genomics*. 8: 191-202.
- Nivens D.E., Ohman D. E., Williams J., Franklin M., 2001, Role of alginate and its acetylation in formation of *Pseudomonas aeruginosa* microcolonies and biofilms. *Journal of Bacteriology* 183(3): 1047-1057
- Núñez C., León R., Guzmán J., Espín G., Soberón-Chávez G. (2000) Role of *Azotobacter vinelandii* *mucA* and *mucC* gen products in alginate production. *Journal of Bacteriology*. 182(23):6550-6556
- Núñez C, Peña C, Kloeckner W, Hernández-Eligio A, Bogachev A, Moreno S, Gúzman J, Büchs J and Espin G (2012) Alginate synthesis in *Azotobacter vinelandii* is increased by reducing the intracellular production of ubiquinone. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Doi: 10.1007/s00253-012-4329-0
- Oelze J. (2000) Respiratory protection of nitrogenase in *Azotobacter* species: is a widely held hypothesis unequivocally supported by experimental evidence? *FEMS Microbiology Reviews*. 24: 321-333.
- Paletta J.I. and Ohman D.E. (2012) Evidence of two promoters internal to the alginate biosynthesis operon in *Pseudomonas aeruginosa*. *Current Microbiology*. Doi:10.1007/s00284-012-0228-y

- Peña C., Campos N. and Galindo E. (1997) Changes in alginate molecular mass distributions, broth viscosity and morphology of *Azotobacter vinelandii* cultured in shake flasks. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 48: 510-515.
- Peña C., Trujillo-Roldán M. A. and Galindo E. (2000) Influence of dissolved oxygen tension and agitation speed on alginate production and its molecular weight in cultures of *Azotobacter vinelandii*. *Enzyme and Microbiology Technology*. 27: 390-398.
- Peña C., Hernández L. and Galindo E. (2006) Manipulation of the acetylation degree of *Azotobacter vinelandii* alginate by supplementing the culture medium with 3-(N-morpholino)-propane sulfonic acid. *Letters in Applied Microbiology*. 43:200-204.
- Peña C, Peter C, Büchs J, and Galindo E. (2007) Evolution of the specific power consumption and oxygen transfer rate in alginate-producing cultures of *Azotobacter vinelandii* conducted in shake flasks. *Biochemical Engineering Journal*. 36: 73-80
- Peña C, Castillo T, Núñez C and Segura D (2011a) Bioprocess design: fermentation strategies for improving the production of alginate and poly  $\beta$  hydroxyalkanoates (PHAs) by *Azotobacter vinelandii*. In: INTECH- Open Access Publisher. London, UK. 217-242.
- Peña C., Galindo E., Büchs J. (2011b) The viscosifying power, degree of acetylation and molecular mass of the alginate produced by *Azotobacter vinelandii* in shake flasks are determined by the oxygen transfer rate. *Process Biochemistry*. 46: 290-297.
- Portais J.-C., Delort A.-M. (2002) Carbohydrate cycling in micro-organisms what can  $^{13}\text{C}$ -NMR tell us? *FEMS Microbiology Review*. 26: 375-402.
- Poole R. K., Hill S. (1997) Respiratory protection of nitrogenase activity in *Azotobacter vinelandii*-roles of the terminal oxydases. *Bioscience Reports*.17(3):303-317.
- Priego-Jiménez R., Peña C., Ramírez O., Galindo E. (2005) Specific growth rate determines the molecular mass of the alginate produced by *Azotobacter vinelandii*. *Biochemical Engineering Journal* 25: 187-193.
- Pyla R, Kim T.-J., Silva J.L., Jung Y.-S. (2009) Overproduction of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate in the *Azotobacter vinelandii* mutant that does not express small RNA Arrf. *Applied Microbiology and Biotechnology*.84:717-724.

- Quintero R. (1981) Ingeniería bioquímica: teoría y aplicaciones. Ed. Alhambra Mexicana. México D. F.
- Re'em T., Tsur-Gang O., Cohen S., (2010) The effect of immobilized RGD peptide in macroporous alginate scaffolds on TGF $\beta$ 1-induced chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *Biomaterials*.31:6746-6755.
- Rehm B. (1996) The *Azotobacter vinelandii* gene *algJ* encodes an outer-membrane protein presumably involved in export of alginate. *Microbiology*. 142:873-880.
- Remminghorst U. and Rehm B. H. A. (2006a) Bacterial alginates: from biosynthesis to applications. *Biotechnology Letters* 28:1701–1712.
- Remminghorst U. and Rehm B.H.A. (2006b) *In vitro* alginate polymerization and the functional role of Alg8 in alginate production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology* 72(1): 298-305.
- Romero Y. Moreno S., Guzmán J. Espin G. and Segura D. (2013) Sigma factor RpoS controls alkylresorcinol synthesis through Arp, a Lys-type regulatory protein, during encystment of *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*. 195(8):1834-1844.
- Sabra W., Zeng A.-P., Sabry S., Omar S., and Deckwer W.-D. (1999) Effect of phosphate and oxygen concentrations on alginate production and stoichiometry of metabolism of *Azotobacter vinelandii* under microaerobic conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology* 52: 773-780.
- Sabra W, Zeng A.-P, Lunsdorf H and Deckwer W-D (2000) Effect of oxygen on formation and structure of *A. vinelandii* alginate and its role in protecting nitrogenase. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (9): 4037-4044.
- Sadoff, H. L. (1975). Encystment and germination in *Azotobacter vinelandii*. *Bacteriological Reviews*, 39, 516-539.
- Schneider K, Schütz V, Gernot T J and Heinzle E. (2010) Optical device for parallel online measurement of dissolved oxygen and pH in shake flask cultures. *Bioprocess Biosystems Engineering*, 33:541-547.

- Sengha S, Anderson A J, Hacking A J and Dawes E A (1989) The production of alginate by *Pseudomonas mendocina* in batch and continuous culture. *Journal of General Microbiology*, 135: 795-804.
- Senior P.J., Beech G. A., Ritchie G.A.F., Dawes E.A. (1972) The role of oxygen limitation in the formation of Poly- $\beta$ -hidroxybutyrate during batch and continuous culture of *Azotobacter beijerinckii*, *Biochemical Journal*, 128: 1193-1201.
- Setubal J C, dos Santos P, Goldman B S, Ertesvåg H, Espin G, Rubio LM, Valla S, Almeida N F, Balasubramanian D, Cromes L, Curatti L, Du Z, Godsy E, Goodner B, Hellner-Burris K, Hernandez J A, Houmiel K, Imperial J, Kennedy C, Larson T J, Latreille P, Ligon L S, Lu J, Mærk M, Miller N M, Norton S, O'Carroll I P, Paulsen I, Raulfs E, Roemer R, Rosser J, Segura D, Slater S, Stricklin S L, Studholme D J, Sun J, Viana C J, Wallin E, Wang B, Wheeler C, Zhu H, Dean D R, Dixon R and Wood D. (2009) The genome sequence of *Azotobacter vinelandii*, an obligate aerobe specialized to support diverse anaerobic metabolic processes. *Journal of Bacteriology*, 191(14): 4534-4545.
- Skjak-Braek G., Grasdalen H. and Larsen B. (1986) Monomer sequence and acetylation pattern y some bacterial alginates. *Carbohydrate Research*. 154: 239-250.
- Skjak-Braek G., Zanetti F. and Paoletti S. (1989) Effect of acetylation on some solution and gelling properties of alginates. *Carbohydrate Research*, 185:131-138.
- Stanbury P.F., Whitaker A. and Hall. (2003) *Principles of fermentation technology*. Ed. Antony Rowe. Butterworth Heinemann. Gran Bretaña, Segunda edición.
- Still G G and Wang C H. (1964) Glucose catabolism in *Azotobacter vinelandii*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 105: 126-132.
- Svanem B. I. G., Strand W. I., Ertesvag H., Skjak-Braek G., Hartmann M., barbeyron T., Valla S. (2001) The catalytic activities of the bifunctional *Azotobacter vinelandii* mannuran C-5-epimerase and alginate lyase AlgE7 probably originate from the same active site in the enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(34):31542-31550
- Tielen P. Strathmann M., Jaeger K.-E., Flemming H.-C. (2005) Alginate acetylation influences initial surface colonization by mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiological research*. 160:165-176.

- Trujillo-Roldán M., Moreno S., Espin G., Galindo E. (2004) The roles of oxygen and alginate-lyase in determining the molecular weight of alginate produced by *Azotobacter vinelandii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63(6):742-747.
- Vázquez A., Moreno S., Guzmán J., Alvarado A. Espín G.(1999) Transcriptional organization of the *Azotobacter vinelandii* *algGXLVIFA* genes: characterization of *algF* mutants. *Gene*, 232: 217–222.
- Wiechert W. (2001). <sup>13</sup>C Metabolic flux analysis. *Metabolic Engineering*, 3: 195-206
- Windhues T. and Borchard W.( 2003) Effect of acetylation on physico-chemical properties of bacterial and algal alginates in physiological sodium chloride solutions investigated with light scattering techniques. *Carbohydrate Polymers*, 52: 47-52.
- Wittmann C and Heinzle E. (2002) Genealogy profiling through strain improvement by using metabolic network analysis: Metabolic flux genealogy of several generations of Lysine-producing *Corynebacteria*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (12): 5843-5859.
- Wong T Y, Pei H, Bancroft K and Childers G W. (1995) Diauxic growth of *Azotobacter vinelandii* on galactose and glucose: regulation of glucose transport by other hexose. *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (2): 430-433.
- Yang T.H., Frick O., Heinzle E. (2008) Hybrid optimization for <sup>13</sup>C metabolic flux analysis using systems parametrized by compactification, *BMC Systems Biology* 2:29.
- Zapata-Vélez A. y Trujillo-Roldán M.A. (2010) The lack of a nitrogen source and/or the C/N ratio affects the molecular weight of alginate and its productivity in submerged cultures of *Azotobacter vinelandii*. *Annals of Microbiology*, 60: 661-668.

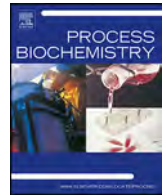
## ANEXO I

### PRODUCTOS GENERADOS



## 1. ARTÍCULO

**Oxygen supply strongly influences metabolic fluxes, production of poly(3-hydroxybutyrate) and alginate, as well as the degree of acetylation of alginate in *Azotobacter vinelandii*, Tania Castillo<sup>1</sup>, Elmar Heinzle<sup>2</sup>, Susanne Peifer<sup>2</sup>, Konstantin Schneider<sup>2</sup> and Carlos F Peña M<sup>1§</sup> *Process Biochemistry* (2013). 48(7), 995-1003.**



# Oxygen supply strongly influences metabolic fluxes, the production of poly(3-hydroxybutyrate) and alginate, and the degree of acetylation of alginate in *Azotobacter vinelandii*

Tania Castillo<sup>a</sup>, Elmar Heinzle<sup>b</sup>, Susanne Peifer<sup>b</sup>, Konstantin Schneider<sup>b</sup>, Carlos F. Peña M<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Post. 510-3 Cuernavaca, 62250 Morelos, Mexico

<sup>b</sup> Biochemical Engineering Institute, Saarland University, Campus A1.5, D-66123 Saarbrücken, Germany

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 29 October 2012

Received in revised form 20 April 2013

Accepted 22 April 2013

Available online 10 May 2013

### Keywords:

*A. vinelandii*

Metabolic flux

Alginate

Acetylation

PHB

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate carbon flux in *Azotobacter vinelandii* using metabolic flux analysis (MFA) under high and low aeration conditions to achieve an improved understanding of how these changes could be related to alginate acetylation and PHB production. Changes in oxygen availability had a considerable impact on the metabolic fluxes and were reflected in the growth rate, the specific glucose consumption rate, and the alginate and PHB yields. The main differences at the metabolic flux level were observed in three important pathways. The first important difference was consistent with respiratory protection; an increase in the flux generated through the tricarboxylic acid (TCA) cycle for cultures grown under high aeration conditions (up to 2.61 times higher) was observed. In the second important difference, the fluxes generated through pyruvate dehydrogenase, phosphoenol pyruvate carboxykinase and pyruvate kinase, all of which are involved in acetyl-CoA metabolism, increased by 10, 43.9 and 17.5%, respectively, in cultures grown under low aeration conditions compared with those grown under high aeration conditions. These changes were related to alginate acetylation, which was 2.6 times higher in the cultures with limited oxygen, and the changes were also related to a drastic increase in PHB production. Finally, the glyoxylate shunt was active under both of the conditions that were tested, and a 2.79-fold increase was observed in cultures that were grown under the low aeration condition.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Alginates are polysaccharides that are produced by brown algae, such as *Laminaria hyperborea*, and bacteria of the genera *Azotobacter* and *Pseudomonas*. Alginates are linear unbranched copolymers of  $\beta$ -D-mannuronic acid (M) and its C5 epimer,  $\alpha$ -L-guluronic acid (G). Bacterial alginates may also contain O-acetyl groups located at O-2 and/or O-3 of mannuronate residues [1,2]. Alginates are widely used in the food and pharmaceutical industries because of their viscosifying, stabilizing and gelling properties [2]. The chemical structure of alginates including the G/M relation, the degree of acetylation and the mean molecular weight (MMW) determines their functional properties. Although alginate can be obtained from brown algae, the main advantage of the alginates produced by

bacteria is that their chemical composition can be modified by changes in the culture conditions [3].

In the case of alginate acetylation, the presence of O-acetyl groups affects the physical properties of alginates by changing the conformation of the polymer [4], reducing the interactions with divalent cations and increasing the solubility in aqueous solutions [5]. It has been observed that small changes in the degree of acetylation have important effects on the viscosity of alginate solutions, independent of the MMW [6]. The swelling capabilities of acetylated alginates are also improved, yielding softer and more hydrated alginate gels [5].

Alginate acetylation also has important biological functions in *Azotobacter vinelandii* and *Pseudomonas*. For example, *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen that requires acetylated alginate to form stable biofilms during infection processes; in addition, the acetylation of alginates enhances the resistance of this bacterium to complement-mediated and opsonic antibody-mediated phagocytosis [7,8]. On the other hand, *A. vinelandii* is capable of differentiating into cysts under conditions of desiccation, and alginate is an important component of the mature cyst structure [9]. Vázquez et al. [9] reported that a mutant strain of *A. vinelandii* (AJ34), which produces unacetylated alginates, had

\* Corresponding author. Tel.: +52 777 329 16 17; fax: +52 777 317 23 88.

E-mail addresses: [tmarenco@ibt.unam.mx](mailto:tmarenco@ibt.unam.mx) (T. Castillo),

[e.heinzle@mx.uni-saarland.de](mailto:e.heinzle@mx.uni-saarland.de) (E. Heinzle), [susanne.peifer@mx.uni-saarland.de](mailto:susanne.peifer@mx.uni-saarland.de) (S. Peifer), [ko.schneider@mx.uni-saarland.de](mailto:ko.schneider@mx.uni-saarland.de) (K. Schneider), [carlosf@ibt.unam.mx](mailto:carlosf@ibt.unam.mx) (C.F. Peña M).

an important reduction (5-fold) in its encystment efficiency. The mutant strain's resistance to desiccation (measured as viability) after 35 days was also lower with respect to the wild type [9]. Additionally, it has been reported that the acetyl group protects the mannuronate residues from guluronate epimerization [4] and protects the polymer from alginate lyase activities [9].

In *Azotobacter*, the main pathway for glucose catabolism is the Entner–Doudoroff (ED) pathway [10]. Glucose is internalized by an inducible Glu-1 permease [11] and phosphorylated by glucokinase to form glucose-6-phosphate (G-6-P). G-6-P is transformed into 6-phosphogluconate by the combined action of glucose-6-phosphate dehydrogenase [12] and 6-phosphogluconolactonase [13]. Then, 6-phosphogluconate enters the ED pathway, where it is converted into 2-keto-3-deoxyphosphogluconate (KDPG) by 6-phosphogluconate dehydratase (Edd). Finally, KDPG is hydrolyzed into glyceraldehyde-3-phosphate (GAP) and pyruvate (PYR) by 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate aldolase [13].

For alginate biosynthesis, GAP is directed to begin gluconeogenesis and forms fructose-6-phosphate (F-6-P) [14]. F-6-P is isomerized by the bifunctional enzyme phosphomannose isomerase/guanosine diphosphomannose pyrophosphorylase (AlgA) to produce mannose-6-phosphate (M-6-P). Phosphomannomutase (AlgC) transforms M-6-P into mannose-1-phosphate (M-1-P), which is converted into GDP-mannose by the enzyme AlgA. GDP-mannose dehydrogenase (AlgD) oxidizes GDP-mannose into GDP-mannuronic acid [14]. All of the above reactions take place in the cytoplasm of the bacteria. GDP-mannuronic acid is then polymerized by the inner membrane proteins Alg8 and Alg44 [14]. In the periplasmic space alginate is susceptible to acetylation, and it is finally exported out of the cell [14].

Acetyl-Coenzyme A (acetyl-CoA) is the primary acetyl donor during acetylation processes catalyzed by a wide number of acetyl transferases, and acetyl-CoA has been proposed as the acetyl donor for alginate acetylation [15]. The O-acetylation of alginates takes place in the periplasmic space of *A. vinelandii* by the action of a protein complex composed of AlgI, AlgV and AlgF [9]. These proteins show high sequence identities with the AlgI, AlgJ and AlgF proteins, respectively, in *P. aeruginosa* [9]. In *P. aeruginosa*, it has been proposed that the AlgI and AlgJ proteins are responsible for the transport of O-acetyl groups from their cytoplasmic precursors across the inner membrane, while AlgF transfers the acetyl groups to the alginate [15].

*A. vinelandii* also produces poly(3-hydroxybutyrate) (PHB), a typical bacterial reserve of carbon and energy, which has potential industrial and commercial uses as a substitute for oil-derived plastics [14]. In *Azotobacter* species, PHB biosynthesis and its regulation are well known [16,17]. Acetyl-CoA is the key precursor during PHB biosynthesis, which begins with the condensation of two acetyl-CoA molecules by the enzyme  $\beta$ -ketothiolase. This condensation is positively regulated by acetyl-CoA, and it is competitively inhibited by free Coenzyme A (CoA) [17].

The role of the oxygen supply in the production of alginate and PHB has been widely studied [3,14]. In the case of alginate, it has been observed that oxygen availability affects not only yields of the polymer but also its chemical structure, primarily its MMW and degree of acetylation [3]. On the other hand, although the process of PHB accumulation in several microorganisms is promoted under conditions of essential nutrient limitation (i.e.,  $\text{NH}_3$  or  $\text{PO}_4$ ) with an excess of a carbon source, in *Azotobacter* vegetative cells, PHB accumulation mainly occurs under oxygen limitation, and it is promoted preferentially during the stationary growth phase [16,17].

*A. vinelandii* has been widely studied for several decades, not only because of its potential to carry out oxygen-sensitive processes even in the presence of oxygen, particularly nitrogen fixation [18], but also due to its ability to produce alginate and PHB [14,18]. However, currently there are no studies utilizing metabolic flux analyses

(MFAs) in *A. vinelandii*. MFA aids the understanding of intracellular carbon fluxes and their regulation [19,20]. MFA also provides a flux map describing the reactions involved in metabolism and an estimate of the steady-state rate at which every reaction occurs [19,20]. In addition, MFA could be used to evaluate the rigidity or flexibility of metabolic branch points according to changes in growth conditions, such as oxygen availability [19,20].

Due to the biological and commercial relevance of *A. vinelandii* and its products, the carbon flux distribution in this bacterium was evaluated under high and low aeration conditions to elucidate how these changes could be related to alginate and PHB production.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Microorganism

Experiments were carried out using wild type *A. vinelandii* ATCC 9046 (American Type Culture Collection). This strain was maintained through monthly subculture on Burk's agar slopes and stored at 4 °C.

### 2.2. Growth conditions

Two growth conditions (high and low aeration) were evaluated in shaken flasks. The first condition was achieved using conventional 500 mL Erlenmeyer flasks filled with 100 mL of media, and the second condition was studied using 500 mL baffled flasks filled with 50 mL of media. The dissolved oxygen tension (DOT) was monitored with PRESENS optical sensors [21]. The cultures under both conditions were incubated at 30 °C at 200 rpm and were monitored for 64 h.

### 2.3. Culture medium

Burk's media was used [22] with no nitrogen source and with the following composition: 20 g L<sup>-1</sup> glucose, 0.66 g L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.16 g L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.42 g L<sup>-1</sup> MOPS, 0.05 g L<sup>-1</sup> CaSO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.2 g L<sup>-1</sup> NaCl, 0.2 g L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>, 0.0029 g L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O and 0.027 g L<sup>-1</sup> FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O. The initial pH was adjusted to 7.2 using NaOH (1 N) before autoclaving.

### 2.4. Cultures

For each condition, three replicates were performed to quantify the growth, degree of alginate acetylation and production of alginate and PHB. Each experimental flask was inoculated with 10% of its total volume. Pre-cultures were grown for 15 h under high aeration conditions in 500 mL baffled flasks with 50 mL of culture media. Under this growth condition, cells did not accumulate PHB. Samples were taken every 1 or 2 h during the exponential growth phase and every 4 or 6 h during the stationary phase. All samples were immediately centrifuged at 13,000 rpm and 4 °C to separate the biomass from the supernatant. The samples were stored at -20 °C for future analyses.

### 2.5. Cell growth

Microbial growth was evaluated by optical density (O.D.) at a wavelength of 560 nm. Measurements of absorbance were performed in duplicate at each time point. In addition, dry weight measurements were carried out using 1 mL of culture. The samples were placed in 1.5 mL Eppendorf tubes that had been previously dried and weighed. Then, samples were centrifuged at 13,000 rpm for 15 min at 4 °C, and the supernatant was recovered for alginate and glucose quantification. Cells were washed twice with distilled water and dried at 80 °C until they reached a constant weight. The optical density and dry weight were correlated to produce a standard curve.

### 2.6. Glucose and organic acids quantification

Quantification of the glucose levels in the supernatant was performed by HPLC using an Aminex HPX-87H column (300 mm × 7.8 mm) (Biorad, Hercules, CA, USA). The eluent was H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (7 mM) and was eluted at a flow rate of 0.8 mL min<sup>-1</sup>. Glucose was detected using a refractive index (RI) detector (ERC-7515A, ERC Inc., Altegolfsheim, Regensburg, Germany) [19]. The supernatant was also tested for the presence of organic acids, using the same chromatographic method, followed by UV absorption at 210 nm using a photodiode array detector (ERC Inc., Altegolfsheim, Regensburg, Germany) [19]. However, under both aeration conditions evaluated, no organic acids were detected in the supernatant.

### 2.7. Alginate quantification

Alginate was quantified using a modified carbazole method [23]. Uronic acids were quantified directly from the supernatant. The volume of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-borate used was 1.2 mL instead of the 6 mL that was used in the original technique, and 140  $\mu$ L

of supernatant sample and 40  $\mu\text{L}$  of carbazole solution were used. This method was linear when alginate concentrations were between 10 and 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , and therefore, samples were diluted with Milli Q water to reach concentrations within this range. The calibration curve was generated with algal alginate (Sigma–Aldrich).

### 2.8. Quantification of alginate acetylation

The degree of acetylation was quantified by HPLC [24]. The lyophilized alginate sample (5–10 mg) was weighed, placed in an Eppendorf tube, and dissolved with 500  $\mu\text{L}$  of Milli Q water. Then, 500  $\mu\text{L}$  of NaOH (1 N) was added, and the sample was mixed by vortex. This mixture was incubated at 80 °C for 2 h. Later, samples were cooled and acidified using 625  $\mu\text{L}$  of  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (1.5 M). The samples were then centrifuged at 11,000 rpm for 15 min, and the aqueous phase was recovered for acetate quantification. Acetyl groups were quantified by HPLC using an Aminex HPX-87H column (300 mm  $\times$  7.8 mm) (Biorad, Hercules, CA, USA) at 50 °C, with  $\text{H}_2\text{SO}_4$  as the eluent (7 mM), at a flow rate of 0.65  $\text{mL min}^{-1}$ . Acetic acid detection was performed by UV absorption at 210 nm using a photodiode array detector (Waters 2996).

### 2.9. PHB extraction and quantification

PHB was quantified by HPLC after its conversion into crotonic acid. For this purpose, the biomass was dried under vacuum at 60 °C. The biomass was weighed (3 mg) in 1.5 mL Eppendorf tubes, and then 1 mL of  $\text{H}_2\text{SO}_4$  was added, and the sample was heated at 90 °C for 1 h. Later, the sample was cooled to room temperature and diluted with Milli Q water to reach concentrations within the range of the calibration curve. PHB quantification was performed via HPLC using an Aminex HPX-87H column (300 mm  $\times$  7.8 mm) (Biorad, Hercules, CA, USA) at 50 °C, with  $\text{H}_2\text{SO}_4$  as the eluent (7 mM), at a flow rate of 0.65  $\text{mL min}^{-1}$ . Crotonic acid was detected as UV absorption at 220 nm (HPLC 535, Biotek, Neufahrn, Germany). The standard used was hydroxybutyric acid (Sigma–Aldrich), which was treated in the same manner as the samples.

### 2.10. Labeling experiments

The analysis of in vivo metabolic fluxes was conducted using [ $1\text{-}^{13}\text{C}$ ] glucose as the carbon source. The evaluation of the in vivo activities of the metabolic pathways and the carbon distribution throughout central metabolism was performed after the labeling of proteinogenic amino acids and PHB through GC–MS analysis.

### 2.11. Cultivation and protein hydrolysis

The labeling experiments were developed using the same conditions described above, with two parallel flasks for each condition. The pre-culture and the main culture were grown with [ $1\text{-}^{13}\text{C}$ ] glucose to reduce the effect of naturally labeled carbon stored in the initial population of the main culture. The cells were harvested at two different points during the exponential growth phase for each flask. The cells were centrifuged for 10 min at 13,000 rpm and 4 °C (Biofuge, Fresco, Heraeus, Hanau, Germany), and then the cell pellet was washed twice with Milli Q water. Later, the cells were hydrolyzed with 6 M HCl (50  $\mu\text{L g}_{\text{CDW}}^{-1}$ ) at 100 °C for 24 h, and the samples were cooled down at room temperature and neutralized with 6 M NaOH (38  $\mu\text{L g}_{\text{CDW}}^{-1}$ ). The neutralized samples were filtered (Ultrafree-MC Centrifugal Filter Devices, 0.22  $\mu\text{m}$ , Amicon Bioseparations, Bedford, MA, USA) to remove any cell debris, and the samples were lyophilized [25].

### 2.12. Derivatization

Derivatization was performed prior to GC–MS analysis. The lyophilized cell extracts were dissolved in 50  $\mu\text{L}$  of 0.1% dimethylformamide (DMF)/pyridine (v/v) and 50  $\mu\text{L}$  of the derivatization reagent N-methyl-N-t-butyltrimethylsilyltrifluoroacetamide, and the mixture was incubated at 80 °C. After incubation, the samples were centrifuged for 15 min at 13,000 rpm and 4 °C (Biofuge, Fresco, Heraeus, Hanau, Germany) to eliminate the salts resulting from the neutralization. The supernatant was recovered and transferred to glass chromatographic vials for GC–MS analysis [19].

### 2.13. Gas chromatography–mass spectrometry

The GC–MS instrument used for the analysis of the isotopomer distribution of proteinogenic amino acids was an HP 6890 gas chromatograph (Hewlett Packard, Palo Alto, California, USA) with a HP-5-MS column. The chromatographic separation was performed under the following conditions: a temperature gradient of 120 °C was held for 5 min followed by an increase of 4 °C  $\text{min}^{-1}$  to 270 °C; then, the temperature was increased at 20 °C  $\text{min}^{-1}$  until 320 °C was reached. The inlet temperature was 300 °C, and detection was performed by a quadrupole detector at a temperature of 320 °C. The volume of the sample injected was 1  $\mu\text{L}$ , and the sample was injected in splitless mode, using a split/splitless injector [19].

**Table 1**

Reactions of the metabolic network used for metabolic flux analysis [26].

vinp:	$\text{GLC}_{\text{lab}} \rightarrow \text{G6P}$
v1:	$\text{F6P} \rightarrow \text{GAP} + \text{DHA}$
v2:	$\text{DHA} \rightarrow \text{GAP}$
v3:	$\text{GAP} \rightarrow \text{3PG}$
v4:	$\text{3PG} \rightarrow \text{PEP}$
v5:	$\text{PEP} \rightarrow \text{PYR}$
v6:	$\text{PYR} \rightarrow \text{ACA} + \text{CO}_2$
v7:	$\text{PYR} + \text{CO}_2 \rightarrow \text{OAA}$
v8:	$\text{OAA} \rightarrow \text{PEP} + \text{CO}_2$
v9:	$\text{G6P} \rightarrow \text{P5P} + \text{CO}_2$
v10[r]:	$2\text{P5P} \rightarrow \text{GAP} + \text{S7P}$
v11[r]:	$\text{GAP} + \text{S7P} \rightarrow \text{F6P} + \text{E4P}$
v12[r]:	$\text{P5P} + \text{E4P} \rightarrow \text{F6P} + \text{GAP}$
v13:	$\text{OAA} + \text{ACA} \rightarrow \text{ICT}$
v14:	$\text{ICT} \rightarrow \text{aKG} + \text{CO}_2$
v15:	$\text{aKG} \rightarrow \text{SUC} + \text{CO}_2$
v16[r]:	$\text{SUC} \rightarrow \text{FUM}$
v17:	$\text{FUM} \rightarrow \text{OAA}$
v18:	$\text{ICT} \rightarrow \text{GOX} + \text{SUC}$
v19:	$\text{ACA} + \text{GOX} \rightarrow \text{OAA}$
v20:	$\text{G6P} \rightarrow \text{KDPG}$
v21:	$\text{KDPG} \rightarrow \text{PYR} + \text{GAP}$
v22:	$\text{F-6-P} \rightarrow \text{MAN-6-P}$
v1 <sub>ext</sub> :	$\text{MAN-6-P} \rightarrow \text{alginate}_{\text{ex}}$
v2 <sub>in</sub> :	$\text{ACA} \rightarrow \text{PHB}_{\text{in}}$

**Table 2**

Metabolite balances using reactions of Table 4 including anabolic reactions [26].

G6P	$\text{vinp} - (\text{v9} + \text{v20} + \text{v}_{\text{B};\text{G6P}}) = 0$
KDPG	$\text{v20} - \text{v21} = 0$
F6P	$(\text{v11} + \text{v12}) - (\text{v1} + \text{v11}[\text{r}] + \text{v12}[\text{r}] + \text{v22} + \text{v}_{\text{B};\text{F6P}}) = 0$
DHA	$\text{v1} - \text{v2} = 0$
GAP	$(\text{v2} + \text{v10} + \text{v11}[\text{r}] + \text{v12}) - (\text{v3} + \text{v10}[\text{r}] + \text{v11} + \text{v12}[\text{r}] + \text{v}_{\text{B};\text{GAP}}) = 0$
3PG	$\text{v3} - (\text{v4} + \text{v}_{\text{B};\text{3PG}}) = 0$
PEP	$(\text{v4} + \text{v8}) - (\text{v5} + \text{v}_{\text{B};\text{PEP}}) = 0$
PYR	$(\text{v5} + \text{v21}) - (\text{v6} + \text{v7} + \text{v}_{\text{B};\text{PYR}}) = 0$
KDPG	$\text{v20} - \text{v21} = 0$
MAN-6P	$\text{v22} - \text{v1}_{\text{ext}} = 0$
ACA	$\text{v6} - (\text{v13} + \text{v19} + \text{v2}_{\text{ext}} + \text{v}_{\text{B};\text{ACA}}) = 0$
OAA	$(\text{v7} + \text{v17} + \text{v19}) - (\text{v8} + \text{v13} + \text{v}_{\text{B};\text{OAA}}) = 0$
ICT	$\text{v13} - (\text{v14} + \text{v18}) = 0$
aKG	$\text{v14} - (\text{v15} + \text{v}_{\text{B};\text{aKG}}) = 0$
SUC	$(\text{v15} + \text{v16}[\text{r}] + \text{v18}) - \text{v16} = 0$
FUM	$\text{v16} - (\text{v16}[\text{r}] - \text{v17}) = 0$
GOX	$\text{v18} - \text{v19} = 0$
P5P	$(\text{v9} + 2\text{v10}[\text{r}] + \text{v12}[\text{r}]) - (\text{v12} + 2\text{v10} + \text{v}_{\text{B};\text{P5P}}) = 0$
E4P	$(\text{v11} + \text{v12}[\text{r}]) - (\text{v11}[\text{r}] + \text{v12} + \text{v}_{\text{B};\text{E4P}}) = 0$
S7P	$(\text{v10} + \text{v11}[\text{r}]) - (\text{v10r} + \text{v11}) = 0$

### 2.14. Automatic integration and isotope GC–MS data correction

The GC–MS data sets obtained in SIM mode were integrated by a program based on MATLAB R2008b (The MathWorks Inc., Natick, MA, USA) to measure the mass isotopomers of every amino acid, and the mass isotopomer abundances were corrected for the occurrence of natural isotopes [25].

### 2.15. Metabolic flux analysis

The metabolic flux analysis was performed using a numerical simulation model [25] executed by MATLAB R2008b (The MathWorks Inc., Natick, MA, USA). Tables 1 and 2 show the reaction metabolite balances used for the metabolic flux analysis [26]; alginate and PHB reactions were also included in the model.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Dissolved oxygen profile and growth rate

Oxygen availability has been described as an important parameter that determines the production of alginate and PHB in *A. vinelandii*, affecting not only the yields of the polymers but also their chemical structures [14,27,28].

**Table 3**  
Growth parameters of *A. vinelandii* under different growth conditions. Values in brackets are calculated using the residual biomass (total biomass – PHB) [43].

Growth condition	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	$Y_{X/S}$ (g <sub>CDW</sub> mol <sup>-1</sup> <sub>glucose</sub> )	$q_s$ (mol h <sup>-1</sup> g <sub>CDW</sub> <sup>-1</sup> )
High aeration	0.17 ± 0.01	18.4 ± 0.57	7.83 ± 0.32
Low aeration	0.08 ± 0.00	66.0 ± 1.30 (19.5 ± 0.14)	0.69 ± 0.07 (0.83 ± 0.11)

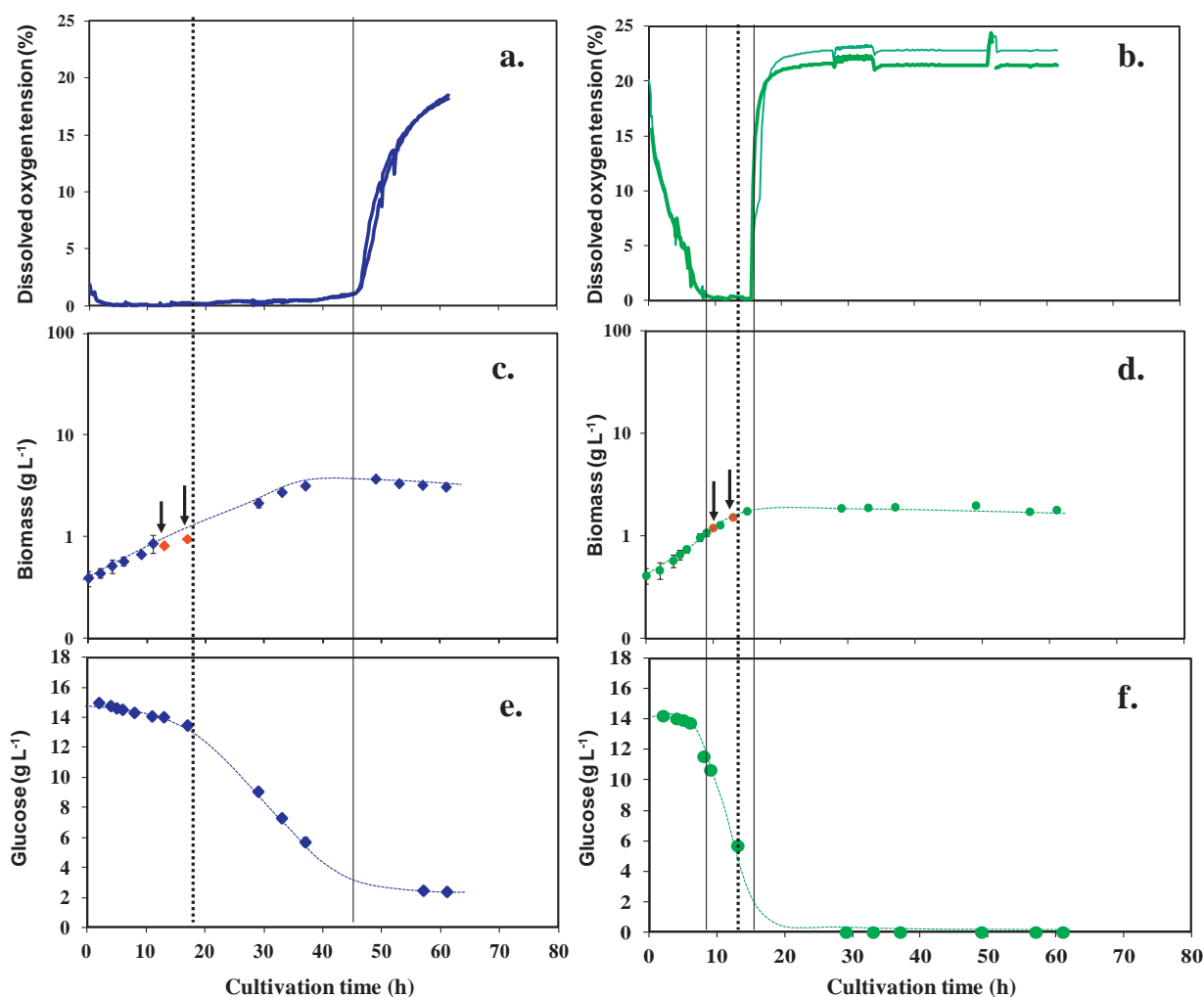
**Table 4**  
Carbon usage of *A. vinelandii* grown under different growth conditions. CO<sub>2est</sub>, NADPH<sub>est</sub> and NADH<sub>est</sub> indicate the amount of these compounds calculated from MFA.

Growth condition	% C-mol <sub>biomass</sub>	% C-mol <sub>PHB</sub>	% C-mol <sub>alginate</sub>	% C-mol <sub>CO<sub>2est</sub></sub>	NADPH <sub>est</sub> (mol mol <sup>-1</sup> <sub>glucose</sub> )	NADH <sub>est</sub> (mol mol <sup>-1</sup> <sub>glucose</sub> )
High aeration	12.5 ± 0.38	–	2.2 ± 0.6	86.27	1.56	7.35
Low aeration	44.7 ± 0.90	21 ± 0.00	11.0 ± 2.3	62.77	0.36	4.77

In shaken flask systems, oxygen availability can be modified by manipulating the flask geometry. It can also be adjusted by altering the gas–liquid mass transfer area and changing the ratio between the media volume (filling volume) and the flask volume [22,29]. To achieve different degrees of oxygen supply in the shaken flasks, two conditions were evaluated. A low aeration condition was achieved using conventional 500 mL Erlenmeyer flasks with a filling volume of 100 mL; and a condition of high aeration was achieved using 500 mL baffled flasks with a filling volume of 50 mL. The dissolved oxygen (DO) profiles that were obtained in the shaken flask cultures

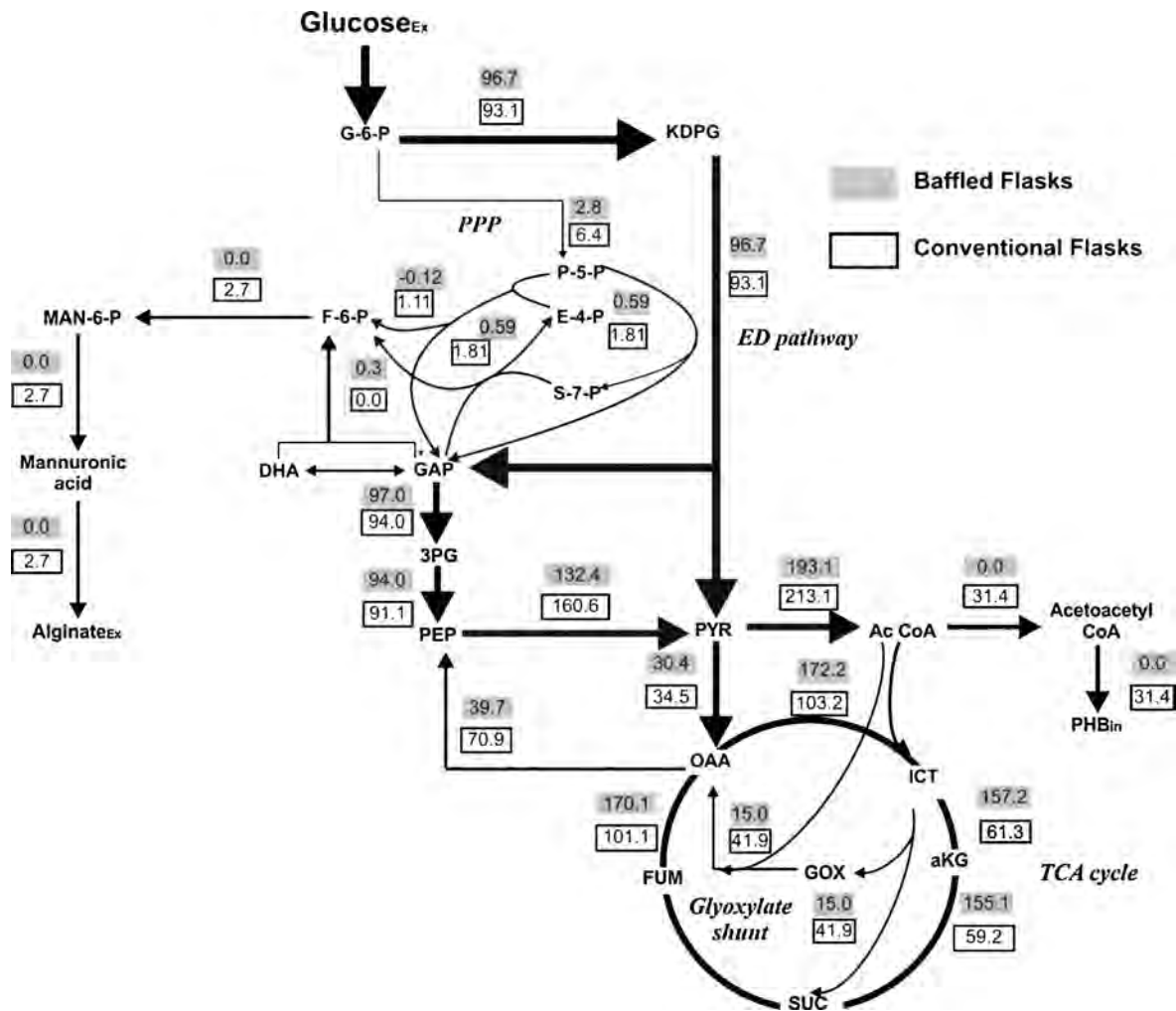
under both low (a) and high aeration (b) conditions are shown in Fig. 1. The DO profiles were determined using the system described by Schneider et al. [21].

Although in both conditions a period of oxygen limitation was observed (when the oxygen levels were close to zero), the maximal oxygen transfer rate (OTR<sub>max</sub>) could be up to 4 times higher in the baffled flasks, according to previous studies [22,29]. In addition, the period of limited oxygen was shorter in the cultures developed in baffled flasks and was observed during the last 8 h of the exponential growth phase (Fig. 1b and d), ending once the



**Fig. 1.** The growth kinetics of *A. vinelandii* ATCC 9046 cultures under low aeration (a, c and e) and high aeration (b, d and f). The oxygen profile was monitored with PRESENS optical sensors [21] and its calibration was carried out with air saturation (a and b). Kinetic growth curves (c and d) and the glucose consumption for cultures of *A. vinelandii* ATCC 9046 (e and f) are shown. Solid lines divide the oxygen limitation periods (oxygen near zero) and dotted lines divide the exponential and stationary growth phases. Arrows indicate the sample points for the metabolic flux analysis. Cultures were carried out in duplicate. The error bars represent standard deviation values.





**Fig. 2.** Metabolic flux maps of parallel cultures of *A. vinelandii* ATCC 9046 grown on  $[1-^{13}\text{C}]$  glucose under low and high aeration conditions. The relative carbon fluxes (mol.%) are related to glucose uptake rates (100%). The biomasses used for MFA were as follows:  $0.81 \pm 0.00 \text{ g}_{\text{CDW}}$  and  $0.95 \pm 0.03 \text{ g}_{\text{CDW}}$  for cultures grown under low aeration and  $1.00 \pm 0.00 \text{ g}_{\text{CDW}}$  and  $1.52 \pm 0.00 \text{ g}_{\text{CDW}}$  for cultures grown under high aeration. The metabolic fluxes for alginate and PHB were calculated based on the MW of the monomers of mannuronic acid ( $194.4 \text{ g mol}^{-1}$ ) and  $\beta$ -hydroxybutyric acid ( $104.1 \text{ g mol}^{-1}$ ), respectively.

stationary phase was reached. In contrast, in the cultures developed in conventional flasks, the oxygen limitation began at the start of the exponential growth phase and lasted up to 40 h (Fig. 1a and c).

The differences in oxygen availability had an important effect on growth, as is shown in Fig. 1c and d. When *A. vinelandii* was cultivated under high aeration (baffled flasks), the specific growth rate ( $\mu$ ) was 2-fold higher ( $0.17 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$ ) than that obtained for the cultures grown under low aeration ( $0.081 \pm 0.00 \text{ h}^{-1}$ ).

The changes in the aeration condition affected not only the growth rate but also the specific glucose consumption rate ( $q_s$ ) and the biomass yield ( $Y_{X/S}$ ) (Table 3). The specific glucose consumption rate under the high aeration condition (baffled flasks) was  $7.83 \pm 0.32 \text{ mmol h}^{-1} \text{ g}_{\text{CDW}}^{-1}$ , while in cultures grown under low aeration, the  $q_s$  dropped to  $0.69 \pm 0.07 \text{ mmol h}^{-1} \text{ g}_{\text{CDW}}^{-1}$  (10-fold lower).

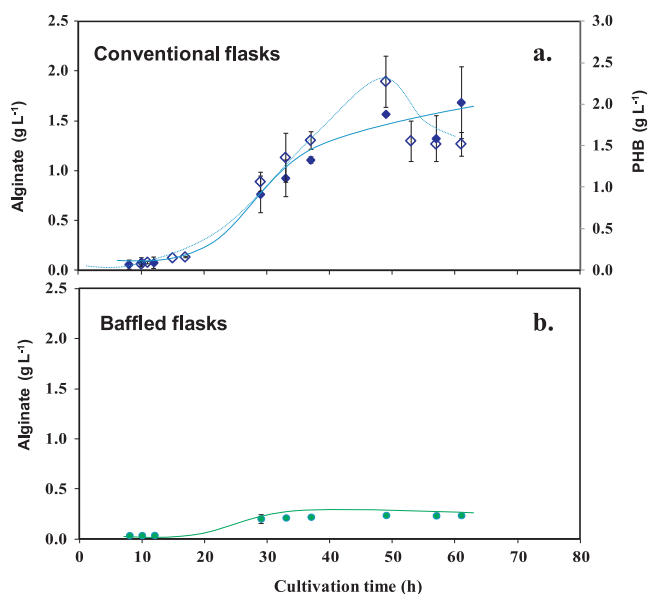
The biomass yield was lower in the cultures grown in baffled flasks ( $18.4 \pm 0.6 \text{ g}_{\text{CDW}} \text{ mol}^{-1}_{\text{glucose}}$ ) than the yield of  $66.0 \pm 1.3 \text{ g}_{\text{CDW}} \text{ mol}^{-1}_{\text{glucose}}$  that was achieved in cultures grown with low aeration (conventional flasks) (Table 3). Moreover, when these data are converted to  $\% \text{ C-mol}_{\text{biomass}} \text{ C-mol}^{-1}_{\text{glucose}}$  (Table 4), it was observed that for the cultures grown at high aeration, only

$12.5 \pm 0.4\% \text{ C-mol}$  was used for biomass production. This percentage increased for the cultures grown at low aeration to  $44.7 \pm 0.9\% \text{ C-mol}$ , of which  $21.0 \pm 0.0\% \text{ C-mol}$  corresponds to PHB accumulation.

### 3.2. Metabolic flux analysis

*A. vinelandii* has been widely studied [14,18], but there has not been MFA studies reported for this bacterium when cultured under two different aeration conditions. MFA provided information that confirmed some of the main physiological responses that were previously described by other authors for *A. vinelandii*, and MFA generated new knowledge related to the metabolism of this microorganism.

The primary changes found in the *A. vinelandii* metabolic fluxes, expressed as mol.% with respect to the glucose uptake rates (100%), are shown in Fig. 2. These results indicate that oxygen availability primarily affected the tricarboxylic acid cycle (TCA cycle), the phosphoenol pyruvate (PEP) and pyruvate (PYR) nodes and the glyoxylate cycle. It must be emphasized that these changes were reflected not only in the growth rate, biomass yields and specific glucose consumption rate, as has been previously described, but also in the production of alginate and PHB.



**Fig. 3.** The evolution of alginate production (closed symbols) and poly-β-hydroxybutyric acid production (open symbols) under low (a) and high (b) aeration conditions in cultures of *A. vinelandii* ATCC9046. The error bars represent standard deviation values.

### 3.3. Entner–Doudoroff pathway

Glucose metabolism in *A. vinelandii* is based on the Entner–Doudoroff (ED) pathway [10,13]. The metabolic flux analysis confirmed this fact, showing that the fluxes through this pathway were higher than 90%. The flux through the ED pathway was very similar under both conditions, with a slightly higher value (a difference of 3.7%) for the cultures growing under high aeration ( $96.7 \pm 0.7\%$ ) than those growing under low aeration ( $93.1 \pm 2.2\%$ ).

It is important to note that alginate biosynthesis is linked to the ED pathway [13] which provides the GAP that is then redirected through gluconeogenesis to form F-6-P, the main precursor of alginates [13]. Although alginate production was observed under both aeration conditions, the flux toward alginate was present only under the low aeration condition ( $2.7 \pm 1.48\%$ ). Alginate production is shown in Fig. 3a and b. In agreement with the results observed by MFA, the alginate production was very low when *A. vinelandii* was grown under high aeration (Fig. 3b), reaching a maximal average concentration of  $0.23 \pm 0.02 \text{ g}_{\text{alginate}} \text{ L}^{-1}$  ( $2.2\% \text{ C-mol}$ , Table 4) at the beginning of the stationary growth phase. In contrast, a maximal alginate concentration of  $1.69 \pm 0.36 \text{ g}_{\text{alginate}} \text{ L}^{-1}$  ( $11.0\% \text{ C-mol}$ , Table 4) was obtained in the conventional flasks (low aeration, Fig. 3a) at the end of the stationary growth phase (60 h). Tables 4 and 5 summarize the alginate yields.

It has been well documented that alginate production is enhanced under conditions of low aeration in conventional flasks. Previously, Peña et al. [27] observed important changes among cultures carried out under different aeration conditions, achieving up to  $4.5 \text{ g}_{\text{alginate}} \text{ L}^{-1}$  using conventional flasks and  $1.5 \text{ g}_{\text{alginate}} \text{ L}^{-1}$  in baffled flasks. The fact that alginate production was positively affected by low aeration conditions, even though the flux toward the ED pathway was practically the same for both conditions tested, could be related to the biological role of alginates in *A. vinelandii*. Alginates are produced as part of the cyst structure that develops in desiccation conditions [9], and in cysts, oxygen limitation would be expected. In addition, it must be emphasized that alginate biosynthesis is a complex process that involves several molecular mechanisms, the regulation of which are poorly

understood [14,28]. Finally, the differences observed between the concentrations reported by Peña et al. [27] and those obtained in the present work could be explained by the use of yeast extract as the nitrogen source in Peña et al. [27], while in the present study, *A. vinelandii* was grown under N<sub>2</sub>-fixing conditions.

In addition to the ED pathway, the oxidative branch of the pentose phosphate pathway (PPP) was active, as has been previously suggested by Beale and Foster [13]. The PPP provides the cell with metabolites, such as NADPH and ribose-5-phosphate (R-5-P), which are required for anabolic reactions and for stress resistance mechanisms [13]. Clear differences between the cultures that were grown in baffled flasks (high aeration) and those that were grown in conventional flasks (low aeration) were found. In the cultures with low aeration, the flux was nearly 2.3 times higher ( $6.4 \pm 2.2\%$ ) than the flux of the cultures with high aeration ( $2.8 \pm 0.7\%$ ). Nevertheless, the flux to the PPP oxidative branch is apparently not sufficient to provide all of the precursor demands. Therefore, the lower part of the PPP (the non-oxidative branch) was also active and operated in the reverse direction to supply erythrose-4-phosphate (E-4-P), R-5-P and other glycolytic precursors [30]. The relative flux through these branches was 1.81% for cultures grown under low aeration and 0.59% for cultures grown in baffled flasks. Carbohydrate cycling via the non-oxidative branch of the PP pathway has been described in other microorganisms such as *Acetobacter*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Paracoccus*, *Sinorhizobium meliloti* and *Xanthomonas* [30]. These microorganisms show metabolic similarities to *A. vinelandii*: they preferentially use the ED pathway and are characterized by their ability to produce exopolysaccharides. Although the relationship between polysaccharide biosynthesis and carbohydrate cycling is not clear, carbohydrate cycling has been observed under conditions favorable for polysaccharide production (i.e. during the non growth phase) [30].

### 3.4. TCA cycle

Aerobic organisms, such as *A. vinelandii*, depend on the TCA cycle to generate NADH and FADH<sub>2</sub> from acetyl-CoA. NADH provides the reductive potential for ATP generation [31]. The fluxes affected in the TCA cycle were (Fig. 2) from oxaloacetate (OAA) to isocitrate (ICT). The flux from OAA to ICT includes the condensation of one molecule of acetyl-CoA with OAA to form citrate (CIT) via citrate synthase and CIT isomerization to ICT via cis aconitase. The flux of OAA to ICT was 66% higher in the cultures grown under high aeration using baffled flasks ( $172.2 \pm 3.6\%$ ) than those grown under low aeration ( $103.2 \pm 3.5\%$ ). It is important to note that in *A. vinelandii*, CIT formation is the first regulation point in the TCA cycle, and this node is down-regulated by the accumulation of NADH [31,32].

After CIT formation, the main increases to relative flux in the cultures grown at high aeration were observed in the fluxes from ICT to α-ketoglutarate (αKG) and from αKG to succinate (SUC). The first reaction is catalyzed by NADP<sup>+</sup>-dependent isocitrate dehydrogenase (ICDH), while the second is catalyzed by the enzymes α-ketoglutarate dehydrogenase (αKGDH) and succinyl-CoA synthetase (SCS). Under high aeration conditions, the flux from ICT to αKG ( $157.2 \pm 5.9\%$ ) was 2.56 times higher than that observed under low aeration conditions ( $61.3 \pm 4.6\%$ ). There was a 2.61-fold increase in the flux from αKG to SUC for cultures grown in baffled flasks ( $155.1 \pm 6.2\%$ ) compared to the results obtained for cultures grown under low aeration ( $59.2 \pm 4.7\%$ ). Both steps are also important regulation points for the TCA cycle and can be down-regulated by NADPH and NADH levels [32–34]. Finally, the relative flux from fumarate (FUM) to OAA, which involves the enzymes succinate dehydrogenase (SDH), fumarate hydratase (FH) and malate dehydrogenase (MDH), increased by 68% when the cultures were grown with high aeration ( $170.1 \pm 3.9\%$ ) versus low aeration ( $101.1 \pm 3.5\%$ ).

*A. vinelandii* is a strict aerobe that is characterized by high respiration rates when exposed to high oxygen concentrations [35]. For this reason, although TCA cycle reactions were present in both conditions, the fluxes through this pathway were markedly higher in the cultures grown under high aeration (baffled flasks). The values were up to 2.6-fold higher for the fluxes through the ICDH and aKGDH/SCS nodes, as has been previously described. These flux increases throughout the TCA cycle during cultivation with high aeration could have an important effect on the availability of reducing power (NADPH and NADH), as is shown in Table 4.

On the other hand, one of the most important characteristics of this bacterium is its potential to carry out oxygen-sensitive processes, particularly nitrogen fixation, even in the presence of high oxygen concentrations [19]. It has been suggested that such processes are possible because *A. vinelandii* has mechanisms to protect its oxygen sensitive nitrogenases [18,35] and that these mechanisms require high energy levels for maintenance and cause low biomass yields when the bacterium is exposed to high oxygen concentrations [35]. One mechanism widely proposed is the regulation of oxygen consumption to maintain low concentrations of cytoplasmic oxygen [35]. Oelze [35] also suggested that N<sub>2</sub> fixation under aerobic conditions requires higher quantities of ATP and reducing equivalents to keep the nitrogenase system in a reduced state.

Such a proposed mechanism could be the reason that low biomass and product yields were obtained under the high aeration condition ( $18.4 \pm 0.57 \text{ g}_{\text{CDW}} \text{ mol}_{\text{glucose}}^{-1}$  and  $4.26 \pm 1.08 \text{ g}_{\text{alginate}} \text{ mol}_{\text{glucose}}^{-1}$ ) in contrast to those obtained under the low aeration condition ( $66.0 \pm 1.30 \text{ g}_{\text{CDW}} \text{ mol}_{\text{glucose}}^{-1}$  and  $21.24 \pm 4.48 \text{ g}_{\text{alginate}} \text{ mol}_{\text{glucose}}^{-1}$ ), even though there was an increase in the flux through the TCA cycle in the cultures under the high aeration condition.

### 3.5. Phosphoenol pyruvate and pyruvate nodes

Pyruvate is located at an important metabolic node between carbohydrate catabolism for energy generation and the biosynthesis of other metabolic compounds. In facultative organisms, such as *Escherichia coli*, pyruvate is a switch point between respiratory and fermentative metabolism [36]. Although *A. vinelandii* is a strict aerobe, in contrast to *E. coli*, there were clear differences in the metabolic fluxes related to pyruvate between the two oxygen conditions tested (Fig. 2).

The first reaction of this cycle is the conversion of phosphoenol pyruvate (PEP) to pyruvate (PYR), which is catalyzed by pyruvate kinase (PYK). The metabolic flux at this point showed an increase of 17.5% in the cultures grown under the low aeration condition in conventional flasks ( $160.6 \pm 4.3\%$ ) compared to those grown in higher aeration conditions in baffled flasks ( $132.4 \pm 1.8\%$ ). PYR then can be converted to acetyl-CoA by the pyruvate dehydrogenase complex (PDHC). At this point, an increase was observed in cultures grown with low aeration, although this change was only a 10% increase (low,  $213.7 \pm 6.0\%$  versus high,  $193.1 \pm 2.6\%$ ).

Finally, important differences were observed in the anaplerotic reaction from OAA to PEP, which is catalyzed by phosphoenol pyruvate carboxykinase (PEPCK). An increase of 43.9% was observed in the flux of the cultures grown under low aeration conditions ( $70.9 \pm 3.1\%$ ) over that obtained in cultures grown in baffled flasks

( $39.7 \pm 2.2\%$ ). It must be emphasized that although the enzymes PYK and PEPCK were involved in recycling PEP and PYR via OAA, the flux from PYR to OAA via pyruvate carboxylase (PYC) was only 11.8% higher in those cultures grown in conventional flasks ( $34.5 \pm 2.6\%$ ) compared with the flux observed in cultures grown under high aeration ( $30.4 \pm 0.9\%$ ).

PHB is accumulated under conditions of excess carbon and limited oxygen [17]. Senior et al. [17] proposed a regulation scheme for PHB biosynthesis based on the hypothesis that with limited oxygen there is an accumulation of reducing power (NADH and NADPH) that leads to the allosteric down-regulation of some TCA cycle enzymes, such as citrate synthase and ICDH. Then, acetyl-CoA can be diverted from the TCA cycle to PHB biosynthesis [17,33].

MFA confirmed this behavior, showing a remarkable reduction of the fluxes in the TCA cycle under the low aeration condition (conventional flasks). In addition, these cultures showed increased metabolic fluxes for PEPCK, PK and PDH, which are involved in acetyl-CoA metabolism. These increased fluxes had an important impact on the metabolic flux for PHB synthesis ( $31.4 \pm 0.2\%$ ) under low aeration conditions, while in the high aeration condition the metabolic flux for PHB synthesis was zero.

PHB production is shown in Fig. 3a. In agreement with the results of the MFA, PHB production was present only in cells grown under low aeration conditions (conventional flasks). PHB reached a maximum concentration of  $2.27 \pm 0.31 \text{ g}_{\text{PHB}} \text{ L}^{-1}$  after approximately 49 h of culture time. After that point, the PHB concentration dropped, reaching  $1.5 \text{ g}_{\text{PHB}} \text{ L}^{-1}$  at the end of the culture (60 h). It appears that PHB was being degraded after 49 h, although at that culture stage the glucose was not entirely exhausted ( $2.5 \text{ g L}^{-1}$ , Fig. 1e), which suggests a higher depolymerization activity. This behavior has been described previously in *Rhizobium*, *Pseudomonas* and *Cupriavidus necator*, where the intracellular content of PHB reaches a peak concentration that is followed by a decrease during the stationary growth phase [37].

However, acetyl-CoA is not used solely for PHB production – it is also the donor of the acetyl groups that are needed for alginate acetylation [15]. The degree of alginate acetylation was 2.6 times higher in the cultures grown under low aeration conditions (conventional flasks), where an acetylation degree of  $4.7 \pm 0.5\%$  was observed compared with an acetylation degree of only  $1.8 \pm 0.6\%$  for cultures grown in the baffled flasks (Table 5). These changes support the hypothesis that acetyl-CoA availability for alginate acetylation increases under low aeration conditions in the same way that has been described for PHB production.

### 3.6. Glyoxylate cycle

Previously, Segura and Espin [38] observed that a mutant strain of *A. vinelandii* (AJ1678) with an inactivated *pycA* (the gene that encodes a subunit of the pyruvate carboxylase enzyme) was unable to grow on liquid minimal Burk's medium with glucose or sucrose as the sole carbon source. They proposed that pyruvate carboxylase was the only enzyme responsible for providing OAA to *A. vinelandii*. Surprisingly, the results of the MFA in the present study demonstrated that the glyoxylate shunt, which is an anaplerotic pathway that also provides OAA, was active under both aeration conditions.

The glyoxylate shunt involves two enzymes, isocitrate lyase (ICL), which catalyze the cleavage of ICT to SUC and glyoxylate, and

**Table 5**

Alginate production parameters of *A. vinelandii* grown under different growth conditions. Values in brackets are calculated using the residual biomass concept (total biomass – PHB) [43].

Growth condition	$Y_{\text{alginate}/\text{glucose}}$ ( $\text{g}_{\text{alginate}} \text{ mol}_{\text{glucose}}^{-1}$ )	$q_{\text{alginate}}$ ( $\text{g}_{\text{alginate}} \text{ h}^{-1} \text{ g}_{\text{CDW}}^{-1}$ )	Degree of acetylation ( $\text{g}_{\text{acetyl}} 100 \text{ g}_{\text{alginate}}^{-1}$ )
High aeration	$4.26 \pm 1.08$	$0.010 \pm 0.003$	$1.8 \pm 0.6$
Low aeration	$21.24 \pm 4.48$	$0.053 \pm 0.012$ ( $0.055 \pm 0.011$ )	$4.7 \pm 0.5$



malate synthase (MS), which catalyze the condensation of acetyl-CoA and glyoxylate to form malate [39]. A 2.79-fold increase was found in the flux through this pathway with low aeration, where the flux was  $41.9 \pm 3.9\%$ , when compared with a relative flux of  $15.0 \pm 3.0\%$ , which was obtained for the high aeration condition (baffled flasks).

The glyoxylate cycle is a metabolic pathway that replenishes the C<sub>4</sub> compounds of the TCA cycle [39]. The glyoxylate cycle has been reported to be essential for an organism's growth on C<sub>2</sub> carbon sources such as ethanol and acetate, as well as on fatty acids [39]. The expression of ICL in organisms such as *E. coli*, *Mycobacterium tuberculosis* and *Corynebacterium glutamicum* depends on the type of carbon source on which the organism is grown. In those microorganisms, ICL is up-regulated when acetate is used as the carbon source, and it is weakly or not expressed when glucose is used [39]. Although the carbon source in the present study was glucose, a metabolic flux through this cycle was present under both conditions tested. To confirm these results, the specific activity of ICL was measured, and ICL was detected under both aeration conditions (data not shown). Previously, Nagai et al. [40] also reported ICL activity for this strain of *A. vinelandii*. These results suggest that under low aeration conditions, the glyoxylate cycle replenishes OAA, which in turn can be directed to PYR and acetyl-CoA, increasing the availability of acetyl-CoA for PHB biosynthesis and alginate acetylation.

In addition, in this bacterium, the glyoxylate shunt could have roles other than those described previously. In *E. coli*, some authors have proposed that the glyoxylate shunt can be used to equilibrate the NADPH/NADP<sup>+</sup> ratio [41], which could be the modulating factor for ICT flux in the TCA cycle and the glyoxylate shunt [42].

#### 4. Conclusions

In the present work, metabolic fluxes in *A. vinelandii* that was cultured under two aeration conditions (high and low) were described. Changes in the aeration conditions clearly affected the metabolic fluxes in *A. vinelandii*, primarily those related to the TCA cycle, the PEP/PYR/acetyl-CoA nodes and the glyoxylate shunt. Under the low aeration condition, it was found that the TCA cycle was down-regulated, while the PEP/PYR/acetyl-CoA nodes and the glyoxylate shunt were up-regulated. Those responses exerted an important effect on both alginate and PHB production, as well as on alginate acetylation. The results obtained in this study provide new information related to the metabolism of *A. vinelandii* that would be useful for designing mutant strains with improved characteristics, such as mutants that overproduce alginate or PHB or produce alginates with a higher degree of acetylation. In addition, this study establishes a basis for future metabolic flux evaluations of this bacterium.

#### Competing interest

The authors declare that they have no competing interests.

#### Authors' contribution

T.C. performed the experiments and analytical determinations and was involved in the preparation of the manuscript. S.P. and K.S. performed the in silico analysis of metabolic flux. E.H. supervised the experimental work performed by T.C. and the in silico analysis of metabolic flux and its interpretation. C.F.P. and E.H. were involved in the design of the present study, in the manuscript preparation and in the critical reading of the manuscript. All authors read and approved the manuscript.

#### Acknowledgements

This work was supported by a Grant from DGAPA-UNAM (Grant IN110310-3) and a Ph.D. Grant to Tania Castillo from Conacyt. The authors acknowledge Dr. Cinthia Núñez, Prof. Enrique Galindo and Dr. Álvaro Lara for their helpful discussions. The authors also acknowledge the technicians and students of Prof. Heinzle's group, who provided very skillful technical assistance.

#### References

- [1] Augst AD, Kong HJ, Mooney DJ. Alginate hydrogels as biomaterials. *Macromol Biosci* 2006;6:623–33.
- [2] Draget KI, Taylor C. Chemical, physical and biological properties of alginates and biomedical implications. *Food Hydrocolloids* 2011;25:251–6.
- [3] Peña C, Galindo E, Büchs J. The viscosifying power, degree of acetylation and molecular mass of the alginate produced by *Azotobacter vinelandii* in shaken flasks are determined by the oxygen transfer rate. *Process Biochem* 2011;46:290–7.
- [4] Straatman A, Windhues T, Borchard W. Effects of acetylation on thermodynamic properties of seaweed alginate in sodium chloride solutions. *Prog Colloid Polym Sci* 2004;127:26–30.
- [5] Windhues T, Borchard W. Effect of acetylation on physico-chemical properties of bacterial and algal alginates in physiological sodium chloride solutions investigated with light scattering techniques. *Carbohydr Polym* 2003;52:47–52.
- [6] Peña C, Hernández L, Galindo E. Manipulation of the acetylation degree of *Azotobacter vinelandii* alginate by supplementing the culture medium with 3-(N-morpholino)-propane-sulfonic acid. *Lett Appl Microbiol* 2006;43:200–4.
- [7] Nivens DE, Ohman DE, Williams J, Franklin M. Role of alginate and its acetylation in formation of *Pseudomonas aeruginosa* microcolonies and biofilms. *J Bacteriol* 2001;183(3):1047–57.
- [8] Chang W-S, Van de Mortel M, Nielsen L, Nino de Guzmán G, Li X, Xalverson LJ. Alginate production by *Pseudomonas putida* creates a hydrated microenvironment and contributes to biofilm architecture and stress tolerance under water-limiting conditions. *J Bacteriol* 2007;189(22):8290–9.
- [9] Vázquez A, Moreno S, Guzmán J, Alvarado A, Espín G. Transcriptional organization of the *Azotobacter vinelandii* *algXLVIFA* genes: characterization of *algF* mutants. *Gene* 1999;232:217–22.
- [10] Mortenson LE, Wilson PW. Initial stages in the breakdown of carbohydrates by the *Azotobacter vinelandii*. *Arch Biochem Biophys* 1954;53(2):425–35.
- [11] Wong TY, Pei H, Bancroft K, Childers GW. Diauxic growth of *Azotobacter vinelandii* on galactose and glucose: regulation of glucose transport by other hexose. *Appl Environ Microbiol* 1995;61(2):430–3.
- [12] Daddaoua A, Krell T, Ramos J-L. Regulation of glucose metabolism in *Pseudomonas* the phosphorylative branch and Entner–Doudoroff enzymes are regulated by a repressor containing a sugar isomerase domain. *J Biol Chem* 2009;284(32):21360–8.
- [13] Beale JM, Foster JL. Carbohydrate fluxes into alginate biosynthesis in *Azotobacter vinelandii* NCIB 8789: NMR investigations of the triose pools. *Biochemistry* 1996;35:4492–501.
- [14] Galindo E, Peña C, Núñez C, Segura D, Espín G. Molecular and bioengineering strategies to improve alginate and polydihydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii*. *Microb Cell Fact* 2007;6(7), <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2589-6-7>.
- [15] Franklin MJ, Douthitt SA, McClure MA. Evidence that the *AlgJ/AlgJ* gene cassette, required for O-acetylation of *Pseudomonas aeruginosa* alginate, evolved by lateral gene transfer. *J Bacteriol* 2004;186(14):4759–73.
- [16] Senior PJ, Beech GA, Ritchie GAF, Dawes EA. The role of oxygen limitation in the formation of poly-β-hydroxybutyrate during batch and continuous culture of *Azotobacter beijerinckii*. *Biochem J* 1972;128:1193–201.
- [17] Senior PJ, Dawes EA. The regulation of poly-hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. *Biochem J* 1973;134:225–38.
- [18] Setubal JC, dos Santos P, Goldman BS, Ertesvåg H, Espin G, Rubio LM, et al. The genome sequence of *Azotobacter vinelandii*, an obligate aerobic specialized to support diverse anaerobic metabolic processes. *J Bacteriol* 2009;191(14):4534–45.
- [19] Wittmann C, Heinzle E. Genealogy profiling through strain improvement by using metabolic network analysis: metabolic flux genealogy of several generations of Lysine-producing *Corynebacteria*. *Appl Environ Microbiol* 2002;68(12):5843–59.
- [20] Wittmann C. Fluxome analysis using GC–MS. *Microb Cell Fact* 2007;6(6), <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2859-6-6>.
- [21] Schneider K, Schütz V, Gernot TJ, Heinzle E. Optical device for parallel online measurement of dissolved oxygen and pH in shake flask cultures. *Bioprocess Biosyst Eng* 2010;33:541–7.
- [22] Peña C, Peter C, Büchs J, Galindo E. Evolution of the specific power consumption and oxygen transfer rate in alginate-producing cultures of *Azotobacter vinelandii* conducted in shaken flasks. *Biochem Eng J* 2007;36:73–80.
- [23] Knutson C, Jeanes A. A new modification of carbazole analysis: applications to heteropolysaccharides. *Anal Biochem* 1967;24:470–81.
- [24] Cheetman NWH, Punruckvong. An HPLC method for the determination of acetyl and pyruvyl groups in polysaccharides. *Carbohydr Polym* 1985;5:399–406.

- [25] Yang TH, Frick O, Heinzle E. Hybrid optimization for  $^{13}\text{C}$  metabolic flux analysis using systems parametrized by compactification. *BMC Syst Biol* 2008;2(29), <http://dx.doi.org/10.1186/1752-0509-2-29>.
- [26] Wittmann C, Heinzle E. Metabolic network analysis and design in *Corynebacterium glutamicum*. In: Burkovski A, editor. *Corynebacteria—genomics and molecular biology*. Caister: Academic Press; 2008. p. 79–112.
- [27] Peña C, Campos N, Galindo E. Changes in alginate molecular mass distributions, broth viscosity and morphology of *Azotobacter vinelandii* cultured in shaken flasks. *Appl Microbiol Biotechnol* 1997;48:510–5.
- [28] Peña C, Castillo T, Núñez C, Segura D. Bioprocess design: fermentation strategies for improving the production of alginate and poly  $\beta$  hydroxyalkanoates (PHAs) by *Azotobacter vinelandii*. In: Carpi A, editor. *Progress in molecular and environmental bioengineering from analysis and modelling to technology applications*. Intech; 2011., ISBN 978-953-307-268-5 p. 217–42 [www.intechopen.com](http://www.intechopen.com)
- [29] Büchs J. Introduction to advantages and problems of shaken cultures. *Biochem Eng J* 2001;7:91–8.
- [30] Portais J-C, Delort A-M. Carbohydrate cycling in micro-organisms what can  $^{13}\text{C}$  NMR tell us? *FEMS Microbiol Rev* 2002;26:375–402.
- [31] Mailloux RJ, Berlault R, Lomire J, Singh R, Cheniet DR, Hamel RD, et al. The tricarboxylic acid cycle, an ancient metabolic network with a novel twist. *PLoS ONE* 2007;2(8), <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0000690>.
- [32] Senior PJ, Dawes EA. Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate biosynthesis and the regulation of glucose metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. *Biochem J* 1971;125:55–66.
- [33] Jackson FA, Dawes EA. Regulation of the tricarboxylic acid cycle and poly- $\beta$ -hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii* grown under nitrogen or oxygen limitation. *J Gen Microbiol* 1976;97:303–12.
- [34] Dunn MF. Tricarboxylic acid cycle and anaplerotic enzymes in *Rhizobia*. *FEMS Microbiol Rev* 1998;22:105–23.
- [35] Oelze J. Respiratory protection of nitrogenase in *Azotobacter* species: is a widely held hypothesis unequivocally supported by experimental evidence? *FEMS Microbiol Rev* 2000;24:321–33.
- [36] Murarka A, Clomburg JM, Moran S, Shanks JV, González R. Metabolic analysis of wild-type *Escherichia coli* and a pyruvate dehydrogenase complex (PDHC)-deficient derivative reveals the role PDHC in the fermentative metabolism of glucose. *J Biol Chem* 2010;285(41):31548–58.
- [37] Jedrossek D, Handrick R. Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates. *Annu Rev Microbiol* 2002;56:403–32.
- [38] Segura D, Espin G. Inactivation of *pycA*, encoding pyruvate carboxylase activity, increases poly- $\beta$ -hydroxybutyrate accumulation in *Azotobacter vinelandii* on solid medium. *Appl Microbiol Biotechnol* 2004;65:414–8.
- [39] Kretzschmar U, Khodaverdi V, Jeoung J-H, Görisch H. Function and transcriptional regulation of isocitrate lyase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch Microbiol* 2008;190:151–8.
- [40] Nagai S, Nishizawa Y, Onedera M, Aiba S. Effect of dissolved oxygen on growth yield and aldolase activity in chemostat culture of *Azotobacter vinelandii*. *J Gen Microbiol* 1971;66:197–203.
- [41] Fischer E, Sauer U. A novel metabolic cycle catalyzes glucose oxidation and anaplerosis in hungry *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 2003;278(47):46446–51.
- [42] Bautista J, Satrustegui J, Machado A. Evidence suggesting that the NADPH/NADP ratio modulates the splitting of the isocitrate flux between glyoxylic and tricarboxylic cycles in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* 1979;105(2):333–6.
- [43] Heinzle E, Lafferty RM. A kinetic model for growth and synthesis of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid (PHB) in *Alcaligenes eutrophus* H 16. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol* 1980;11:8–16.

## 2. ARTÍCULO

The acetylation degree of alginates in *Azotobacter vinelandii* ATCC9046 is determined by dissolved oxygen and specific growth rate: studies in glucose-limited chemostat cultivations, Tania Castillo, Enrique Galindo and Carlos F. Peña\* *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* (2013). 40(7), 715-723.

# The acetylation degree of alginates in *Azotobacter vinelandii* ATCC9046 is determined by dissolved oxygen and specific growth rate: studies in glucose-limited chemostat cultivations

Tania Castillo · Enrique Galindo · Carlos F. Peña

Received: 27 November 2012 / Accepted: 12 April 2013  
© Society for Industrial Microbiology and Biotechnology 2013

**Abstract** Alginates are polysaccharides that may be used as viscosifiers and gel or film-forming agents with a great diversity of applications. The alginates produced by bacteria such as *Azotobacter vinelandii* are acetylated. The presence of acetyl groups in this type of alginate increases its solubility, viscosity, and swelling capability. The aim of this study was to evaluate, in glucose-limited chemostat cultivations of *A. vinelandii* ATCC9046, the influence of dissolved oxygen tension (DO) and specific growth rate ( $\mu$ ) on the degree of acetylation of alginates produced by this bacterium. In glucose-limited chemostat cultivations, the degree of alginate acetylation was evaluated under two conditions of DO (1 and 9 %) and for a range of specific growth rates (0.02–0.15 h<sup>-1</sup>). In addition, the alginate yields and PHB production were evaluated. High DO in the culture resulted in a high degree of alginate acetylation, reaching a maximum acetylation degree of 6.88 % at 9 % DO. In contrast, the increment of  $\mu$  had a negative effect on the production and acetylation of the polymer. It was found that at high DO (9 %) and low  $\mu$ , there was a reduction of the respiration rate, and the PHB accumulation was negligible, suggesting that the flux of acetyl-CoA (the acetyl donor) was diverted to alginate acetylation.

**Keywords** *Azotobacter vinelandii* · Alginate acetylation · Specific growth rate · Dissolved oxygen tension · Poly(3-hydroxybutyrate)

## Introduction

Alginates are a family of linear copolymers conformed by (1-4)-linked  $\beta$ -D-mannuronic acid (M) and  $\alpha$ -L-guluronic acid (G) [9]. These polymers are covalently linked in different sequences, which may be found as homopolymeric blocks (MMMMM, GGGGG) or heteropolymeric blocks (MGMGMG) [2, 23]. Alginates are obtained from brown algae and bacteria of the genera *Azotobacter* and *Pseudomonas* [10]. Alginates isolated from bacteria differ from those obtained from algae because these polymers are acetylated on the C-2 and/or C-3 residues of the mannuronic acid units [30]. Alginates have been used in several industries as viscosifiers and gel- or film-forming agents. In recent years, these polymers have been used as matrices for cell immobilization and controlled delivery systems for drugs [2, 23].

The chemical structures of alginates influence their properties and potential applications. Specifically, the presence of *O*-acetyl groups modifies the alginates conformation [32]. The acetylation of alginates increases their solubility in aqueous solutions and reduces the interaction with divalent cations [31]. Small changes in the degree of acetylation positively affect the viscosities of alginate solutions independent of the effects of mean molecular weight (MMW) [21, 32]. In addition, the gels of acetylated alginates show high swelling capabilities resulting in softer and more-hydrated gels [31, 35].

It has been observed that alginate acetylation plays important biological functions in *A. vinelandii* and

T. Castillo · E. Galindo · C. F. Peña (✉)  
Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Post. 510-3 Cuernavaca, 62250 Morelos, Mexico  
e-mail: carlosf@ibt.unam.mx

T. Castillo  
e-mail: tmarenc@ibt.unam.mx

E. Galindo  
e-mail: galindo@ibt.unam.mx

*Pseudomonas*. In the case of *A. vinelandii*, this bacterium produces cysts resistant to desiccation, and alginate is an important component of these structures [34]. In a mutant strain of *A. vinelandii* (AJ34) that produces unacetylated alginates, Vázquez et al. [34] observed important reductions in encystment efficiency and resistance to desiccation when compared with the wild type. In the case of *Pseudomonas aeruginosa*, an opportunistic pathogen, it has been observed that the organism requires acetylated alginate for the formation and stability of biofilms during its infection processes; in addition, the acetylation of alginates enhances the resistance of this bacterium to complement-mediated and opsonic antibody-mediated phagocytosis [3, 17, 33]. It must be emphasized that cysts and biofilms occur in environments under nutrient limitations [36] and, therefore, low specific growth rates [15]. In addition, it has been proposed that the acetyl groups confer protection to the polymer from the activities of alginate lyases and epimerases [19, 32].

*A. vinelandii* also produces poly(3-hydroxybutyrate) (PHB), which is an intracellular polymer belonging to the family of polyhydroxyalkanoates (PHAs). This product is accumulated under unbalanced growth conditions, mainly oxygen limitation, as a carbon and energy reserve material. Recently, PHB has acquired importance because it is a biodegradable and biocompatible thermoplastic that can be used in a wide variety of products as a substitute for plastics derived from oil [10].

The effects of dissolved oxygen tension (DO) and specific growth rate ( $\mu$ ) on the production of alginate and its chemical composition, mainly its MMW, have been widely studied in batch and chemostat cultivations of *A. vinelandii* [16, 20, 24–26].

Nevertheless, it is important to note that the fermentation parameters that affect the degree of acetylation of alginates produced by *A. vinelandii* have been little studied. It has been reported that changes in the medium composition, such as the addition of pH buffers such as MOPS [21], as well as changes in calcium and phosphate concentrations [1] impact the degree of alginate acetylation.

Other studies have described the effect of  $\mu$  on the acetylation degree of alginates [1]. Those authors observed that the acetylation degree of alginates increased from  $0.05 \text{ mol}_{\text{Acetyl}} \text{ mol}_{\text{Alg}}^{-1}$ , obtained at  $\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$ , to  $0.35 \text{ mol}_{\text{Acetyl}} \text{ mol}_{\text{Alg}}^{-1}$ , when  $\mu$  was  $0.32 \text{ h}^{-1}$ , using calcium and phosphate concentrations of 1.5 and 2 mM, respectively.

Recently, Peña et al. [22] showed that in cultures developed in shake flasks at low shaking frequency, in which the oxygen transfer rate (OTR) was low, the acetylation degree of the polymer was higher ( $5.8 \pm 0.3 \%$ ) compared with the values obtained ( $3.5 \pm 0.3 \%$ ) at a higher shaking rate and therefore higher OTR. However, in

those experiments, it was not possible to discriminate between the influence of oxygen in the bulk liquid and that of the specific growth rate on the degree of acetylation of the alginates.

The aim of this study was to evaluate how dissolved oxygen (DO) and specific growth rate ( $\mu$ ) affect the degree of acetylation of alginates produced by *A. vinelandii* ATCC9046 in chemostat cultures.

## Materials and methods

### Microorganism

Experiments were carried out using wild-type *A. vinelandii* ATCC 9046 (American Type Culture Collection). This strain was maintained using monthly subcultures on Burk's agar slopes and stored at 4 °C.

### Culture medium

The medium used was the nitrogen-free modified Burk's medium [20] with the following composition (in  $\text{g l}^{-1}$ ):  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.66,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.16, MOPS 1.42,  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.05, NaCl 0.2,  $\text{MgSO}_4$  0.2,  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.0029, and  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.027. The glucose concentration used for batch stage cultivation was  $6 \text{ g l}^{-1}$ , and for chemostat stage cultivation, it was  $4 \text{ g l}^{-1}$ . The initial pH was adjusted to 7.2 with 1 N NaOH before autoclaving.

### Chemostat cultures

Chemostat experiments were performed in a 3-l bioreactor (Applikon Schiedam, Netherlands) using a 2-l working volume. The pH was kept constant at  $7.2 \pm 0.1$ , and it was controlled by the addition of 1 N NaOH. Temperature was maintained at 29 °C. The bioreactor was equipped with two Rushton turbines ( $D_T/T = 1/3$ , where  $D_T$  was the turbine diameter, and  $T$  the bioreactor diameter), and it was agitated at 300 rpm. The aeration rate was 0.5 vvm. The working volume was kept constant by feeding fresh medium and withdrawing culture broth through a continuously operating peristaltic pump (Easy load Masterflex, USA). Three DO conditions were evaluated (1, 5 and 9 %). Based on the chemostat theory, we considered  $\mu = D$  (where  $\mu$  was the specific growth rate and  $D$  the dilution rate). The range of  $D$  evaluated for the cultivations conducted at 1 and 5 % DO were from 0.02 to  $0.08 \text{ h}^{-1}$ . The cultivations conducted at the DO of 9 % were evaluated for values of  $D$  of 0.04, 0.08, and  $0.15 \text{ h}^{-1}$ . The upper limits of  $D$  used for the experiments ( $0.08$  and  $0.15 \text{ h}^{-1}$ , respectively), were 80 % of  $\mu_{\text{max}}$  for each DO. The values of  $\mu_{\text{max}}$  were previously determined in batch cultivations of *A. vinelandii* at



the different DOs using the same culture conditions (pH = 7.2, 29 °C, 300 rpm and 0.5 vvm). DO was measured using a polarographic oxygen probe (Applikon Schiedam, Netherlands), and it was controlled at the operational temperature (29 °C) by gas blending, automatically varying the proportions of nitrogen and oxygen in the inflowing gas through two 5850F mass flow controllers (Brook Instruments B.V., Netherlands) and using a system based on a PID control that has been previously described [16]. The steady-state condition was achieved after three residence times, when biomass concentration remained constant ( $\leq 10$  % variation). For each condition, three independent cultures were run, and three independent samples were taken during three residence-time after the steady state was reached. For all the conditions, there was no detected residual glucose (the limiting substrate).

### Analytical methods

#### *Cell growth, alginate, and glucose concentration assessments*

Microbial growth was evaluated using optical density (O.D.) at a wavelength of 560 nm. Measurements of absorbance were performed in duplicate for each time point. In addition, dry-weight measurements were performed using 10-ml samples of culture broth. Each sample was centrifuged at 11,000 rpm for 15 min, the pellet was recovered and filtered, dried and weighed using cellulose acetate filters (0.2- $\mu\text{m}$  pore size, Sartorius Biolab Products) as detailed by Peña et al. [20]. Alginate quantification was performed by dry weight as described previously by Peña et al. [20]. From each sample used for biomass dry weight determination, the supernatant was recovered, and alginate was precipitated by adding three volumes of propan-2-ol. The precipitated alginate was filtered and dried at 80 °C for 24 h, to a constant weight, as was described previously [20]. Glucose quantification was performed by HPLC using an Aminex HPX-87H column (300  $\times$  7.8 mm) (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The eluent used was H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (7 mM) at a flow rate of 0.8 ml min<sup>-1</sup>. Glucose detection was achieved using a refractive index (RI) detector (Waters 2414 detector).

#### *Quantification of alginate acetylation*

The degree of acetylation was quantified using HPLC [4]. Each lyophilized alginate sample (5–10 mg) was weighed and placed in an Eppendorf tube, and it was dissolved with 500  $\mu\text{l}$  Milli Q water. Subsequently, 500  $\mu\text{l}$  of 1 N NaOH were added, and the sample was mixed by vortexing. This mixture was incubated at 80 °C for 2 h. Later, the sample was cooled and acidified by the addition of 625  $\mu\text{l}$  of 1.5 M

H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. The sample was centrifuged at 11,000 rpm for 15 min, and the aqueous phase was recovered for acetate quantification. Acetyl groups were quantified by HPLC using an Aminex HPX-87H column (300  $\times$  7.8 mm) (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) at 50 °C and using H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (7 mM) as the eluent with a flow rate of 0.65 ml min<sup>-1</sup>. The acetic acid concentration was determined by UV absorption at 210 nm using a photodiode array detector (Waters 2996), under these chromatographic conditions, acetate eluted at 13.17  $\pm$  0.05 min (Fig. 1a). Figure 1b shows a chromatographic profile for the acetate quantification of an acetylated alginate sample after hydrolysis with 1 M NaOH, in which the acetate peak is separated from those of other, unknown, hydrolysis products of alginate (Fig. 1c).

#### *Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) quantification*

PHB content was quantified by HPLC, after its conversion into crotonic acid. Firstly, the biomass was dried under vacuum at 60 °C. For each sample, 3 mg of biomass was weighed in a 1.5-ml Eppendorf tube; 1 ml of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> was added, and the sample was heated at 90 °C for 1 h. Subsequently, the sample was cooled at room temperature and diluted with Milli-Q water to concentrations within the range of the calibration curve. The PHB quantification was performed using an HPLC system with an Aminex HPX-87H column (300  $\times$  7.8 mm) (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) at 50 °C and using H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (7 mM) as the eluent with a flow rate of 0.65 ml min<sup>-1</sup>. Crotonic acid was quantified using UV absorption at 220 nm. The standard was a commercial PHB (Sigma-Aldrich) that was treated identically as the samples.

#### *Oxygen transfer rate and specific oxygen uptake rate determinations*

Equations used for determinations of specific oxygen uptake rates were as follows:

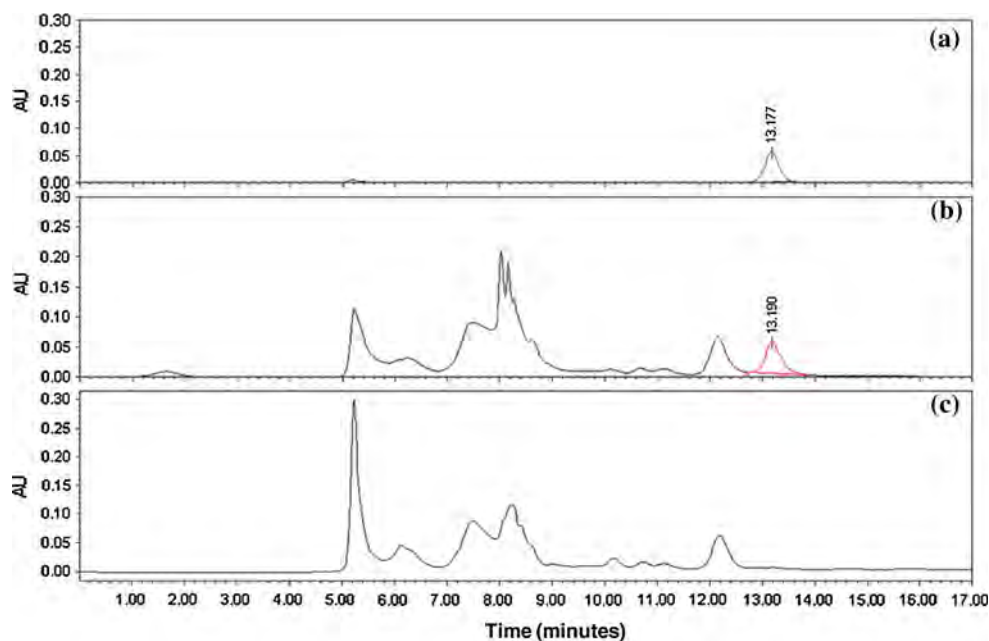
$$C_g = \frac{F_{O_2}}{F_T} [O_2] \quad (1)$$

$$\text{OTR} = k_1 a (C_g - C_L) \quad (2)$$

$$q_{O_2} = \frac{\text{OTR}}{X} \quad (3)$$

where  $C_g$  (mmol l<sup>-1</sup>) was the dissolved oxygen concentration at equilibrium, calculated based on the proportion of the flux of oxygen at the inlet ( $F_{O_2}$ ; l h<sup>-1</sup>) of the system and the total flux of gas at the inlet ( $F_T$ ; l h<sup>-1</sup>), OTR (mmol l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) was the OTR,  $k_1 a$  (h<sup>-1</sup>) was the volumetric oxygen transfer coefficient,  $C_L$  (mmol l<sup>-1</sup>) was the dissolved oxygen concentration,  $q_{O_2}$  (mmol g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) the

**Fig. 1** Acetate standard 0.05 mM (a). Chromatographic profile of acetylated alginate hydrolyzed with 1 M NaOH at 80 °C (b). Chromatographic profile of algal alginate hydrolyzed with 1 M NaOH at 80 °C, negative control (c)



specific oxygen uptake rate and  $X$  ( $\text{g l}^{-1}$ ) was the biomass concentration. For chemostat cultures at constant DO and for conditions of steady state, the OTR is equal to the oxygen uptake rate (OUR).

## Results

### Dissolved oxygen profiles, biomass, and PHB production

To evaluate the effect of DO on the acetylation of alginates, three DO conditions were tested: 1 %, which is known as a condition that promotes production of alginate and PHB by *A. vinelandii* [20], and two conditions, 5 and 9 % DO, under which there are no oxygen limitations and alginate production is present [25]. Figure 2a shows dissolved oxygen profiles for the DOs evaluated in this study. The oxygen control during cultivations at the different dilution rates ( $D$ ) was achieved with coefficients of variation of  $\leq 15$  %.

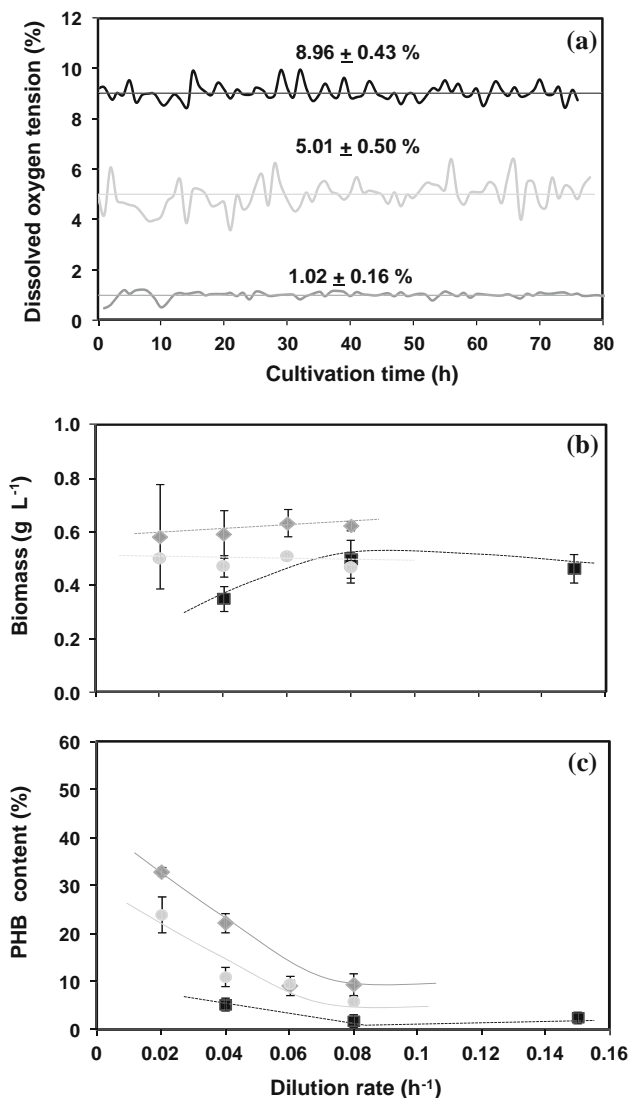
Figure 2b shows the steady-state biomass concentrations in the chemostats and Table 1 summarizes the biomass and product yields on glucose. The highest biomass concentration was of  $0.61 \pm 0.02 \text{ g l}^{-1}$  and this was obtained at 1 % DO, regardless of the  $\mu$  employed (Fig. 2b) and this was coincident with the high PHB content observed under these set of experiments (Fig. 2c). The PHB content in the cultures grown at 1 % DO reached up to 33 % of the total biomass at  $D = 0.02 \text{ h}^{-1}$ ; while the lowest PHB content for the three DO evaluated was obtained at 9 % ( $3.1 \pm 1.5$  % w/w).

Oxygen uptake rate (OUR) and specific oxygen consumption rates ( $q_{\text{O}_2}$ )

Figure 3a, b shows the OUR and the  $q_{\text{O}_2}$  for the different conditions evaluated. For the three DO conditions, these parameters showed increases when the specific growth rate was higher. Significant lower values of OUR and  $q_{\text{O}_2}$ , (OUR =  $2.9 \text{ mmol l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ;  $q_{\text{O}_2}$  =  $4 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) were obtained at 1 % DO and  $D = 0.02 \text{ h}^{-1}$  as compared with the culture developed at 5 % at the same dilution rate (Fig. 3b). In contrast, the highest values for the two parameters were obtained at 9 % DO and  $D = 0.15 \text{ h}^{-1}$  (OUR =  $18.36 \text{ mmol l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ;  $q_{\text{O}_2}$  =  $39.7 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ).

Alginate production and the acetylation degree of alginates

Because there were no significant differences in alginate production parameters, including alginate acetylation, between the cultivations at 1 and 5 % DO (data not shown), the following discussion will be based on the results at 1 and 9 % DO. For the cultivations conducted at 1 % DO, the alginate concentrations and alginate yields based on glucose ( $Y_{\text{Alg/G}}$ ) and biomass ( $Y_{\text{Alg/X}}$ ) did not show significant differences among the dilution rates evaluated (Fig. 4 a, b; Table 1). In contrast, in the cultures conducted at 9 % DO, the highest values of alginate concentration ( $1.19 \pm 0.22 \text{ g}_{\text{Alg}} \text{ l}^{-1}$ ),  $Y_{\text{Alg/G}}$  ( $0.30 \pm 0.06 \text{ g}_{\text{Alg}} \text{ g}_{\text{G}}^{-1}$ ) and  $Y_{\text{Alg/X}}$  ( $3.4 \pm 0.82 \text{ g}_{\text{Alg}} \text{ g}^{-1}$ ) were achieved for the cultivations developed at  $\mu = 0.04 \text{ h}^{-1}$ . These values dropped to  $0.74 \pm 0.04 \text{ g l}^{-1}$  ( $Y_{\text{Alg/G}} = 0.19 \pm 0.01 \text{ g}_{\text{Alg}} \text{ g}_{\text{G}}^{-1}$ ;



**Fig. 2** Dissolved oxygen profiles of the chemostat cultivations of *A. vinelandii* at 1, 5, and 9 % DO (a). Steady-state biomass concentration (b) and PHB concentration (c) for cultivations at 1 % (filled diamond), 5 % (filled circle), and 9 % (filled square) of DO in chemostat cultivations of *A. vinelandii* at different dilution rates

$Y_{Alg/X} = 1.61 \pm 0.12 \text{ g}_{Alg} \text{ g}^{-1}$ ) when the  $\mu$  was increased to  $0.15 \text{ h}^{-1}$ .

Figure 4c shows the degree of acetylation of alginates as a function of  $\mu$  and DO. This was higher in the cultivations developed at 9 % DO, as compared with the degree of acetylation obtained at 1 % DO for the same dilution rates. For both conditions of DO (1 and 9 %), the highest value of acetylation degree of alginates was achieved for  $D = 0.04 \text{ h}^{-1}$ ; however, they showed different trends. A bell-shaped trend was observed for the condition at 1 % DO, with a maximal value at  $D = 0.04 \text{ h}^{-1}$ ; whereas a decreasing profile was evident for the case of 9 %, decreasing acetylation degree from  $6.94 \pm 0.81 \%$  to  $2.25 \pm 0.07 \%$  at  $D = 0.15 \text{ h}^{-1}$  (Fig. 4c).

**Table 1** Biomass, PHB, and alginate yields

DOT (%)	$D$ (h <sup>-1</sup> )	$Y_{X/G}$ (g g <sup>-1</sup> )	$Y_{PHB/G}$ (g <sub>Alg</sub> g <sup>-1</sup> )	$Y_{Alg/G}$ (g <sub>Alg</sub> g <sup>-1</sup> )	Global yields
1	0.02	$0.15 \pm 0.05$	0.048	$0.26 \pm 0.05$	0.41
	0.04	$0.15 \pm 0.02$	0.033	$0.22 \pm 0.03$	0.37
	0.06	$0.16 \pm 0.01$	0.015	$0.21 \pm 0.04$	0.35
	0.08	$0.16 \pm 0.00$	0.015	$0.20 \pm 0.01$	0.34
5	0.02	0.13	0.030	0.24	0.37
	0.04	$0.12 \pm 0.01$	0.013	$0.19 \pm 0.04$	0.31
	0.06	$0.13 \pm 0.01$	0.008	$0.16 \pm 0.03$	0.29
	0.08	$0.12 \pm 0.01$	0.007	$0.17 \pm 0.06$	0.29
9	0.04	$0.09 \pm 0.01$	0.004	$0.3 \pm 0.06$	0.39
	0.08	$0.12 \pm 0.02$	0.002	$0.22 \pm 0.05$	0.34
	0.15	$0.12 \pm 0.01$	0.003	$0.19 \pm 0.01$	0.31

## Discussion

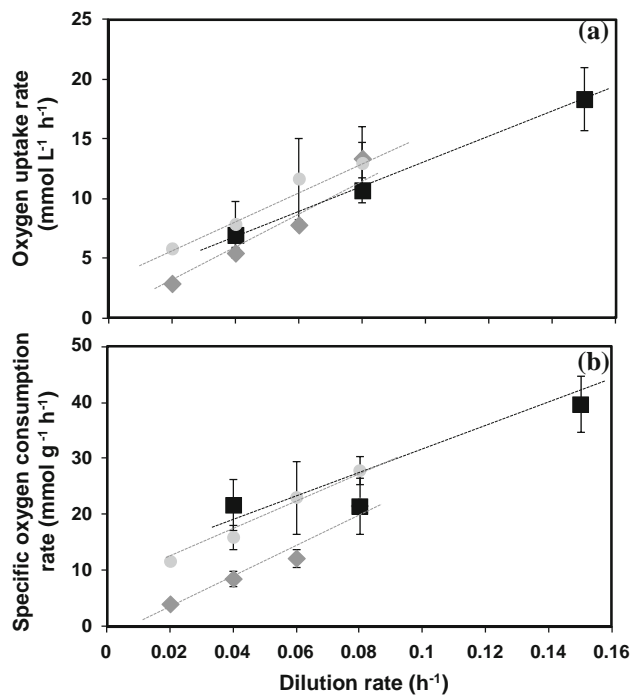
### Effect of the dissolved oxygen

The results of the present study show (Fig. 4c and 5a) that DO (under constant agitation rate and  $D$ ) plays an important role in the acetylation of alginate by *A. vinelandii*. The acetylation degree of alginates was higher in the cultivations conducted at 9 % DO (within a range of  $\mu$  between  $0.04$  and  $0.08 \text{ h}^{-1}$ ) than in those developed at the low DO (1 %). Although the molecular mechanisms involved in the regulation of alginate acetylation as a function of DO are not completely understood, the following explanation may be given.

It has been proposed that acetyl-Coenzyme A (acetyl-CoA) is the acetyl donor for alginate acetylation [5], and it is also the precursor for PHB biosynthesis [29]. Under low oxygen concentration and therefore low oxygen-consumption rate conditions, some enzymes of the tricarboxylic acid cycle (TCA), such as citrate synthase and isocitrate dehydrogenase (ICDH), could be down-regulated by the accumulation of  $\text{NADPH}^+$  and  $\text{NADH}^+$  reducing the flux of acetyl-CoA through the TCA cycle [13, 28] and increasing the availability of acetyl-CoA for processes such as PHB synthesis [13, 28] and alginate acetylation [22]. In our study, the highest alginate acetylation was obtained at 9 % DO and low  $\mu$  ( $0.04 \text{ h}^{-1}$ ); under those conditions, the oxygen uptake rate was very low ( $6.9 \pm 1.1 \text{ mmol l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ), a similar value to that obtained from the cultivations at 1 % (Fig. 3a). It is possible that under those conditions, a reduction of the flux of acetyl-CoA through the TCA cycle could be occurring, which would increase the availability of acetyl-CoA for PHB biosynthesis and acetylation degree.

On the other hand, the % C-mol distribution showed remarkable differences between the cultivations at 1 and 9 % DO (Table 2). In the cultivations conducted at 1 %

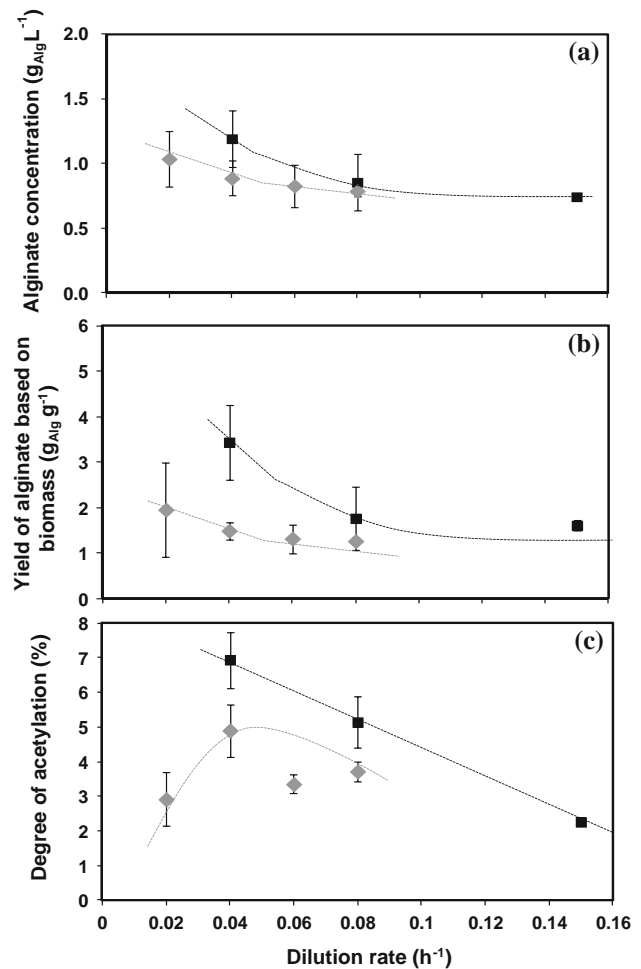




**Fig. 3** Oxygen uptake rate (a) and specific oxygen consumption rate (b) for cultivations at 1 % (filled diamond), 5 % (filled circle), and 9 % (filled square) of DO in chemostat cultivations of *A. vinelandii* at different dilution rates

DO, the % C-mol that was channeled into PHB biosynthesis (mainly provided by acetyl-CoA) was higher (3.8 %) compared with that used for alginate acetylation (1.5 %). In contrast, in the cultures developed at 9 % DO, the % C-mol used for PHB biosynthesis was negligible (0.3–0.5 %), suggesting that acetyl-CoA could be diverted to alginate acetylation, because the % of C-mol used for this purpose was of 2.8 % (Table 2). The fact that content of PHB was higher in the cultivations conducted at 1 % DO could have been the result of the increased levels of NADPH<sup>+</sup>/NADP [28] under low DO. However, it would be of interest to evaluate alginate acetylation in mutant strains of *A. vinelandii* unable to produce PHB to confirm this behavior.

In the cultivations conducted at 9 % DO, not only were the highest levels of alginate acetylation achieved but also increases in alginate yields were obtained relative to the other conditions evaluated, and this behavior was reflected in the % C-mol used for alginate, mainly at  $D = 0.04 \text{ h}^{-1}$  (Table 2). It must be emphasized that the values of  $Y_{\text{Alg}/X}$  reached under such growth conditions were much higher than those reported previously for batch [20] and some chemostat cultures of *A. vinelandii* [6–8, 26]. Our results suggested that under high DO (9 %), the whole process of alginate biosynthesis was favored, including the alginate acetylation. In this line, previously Leitão and Sá-Correia [15] in *P. aeruginosa* found that expression of the genes

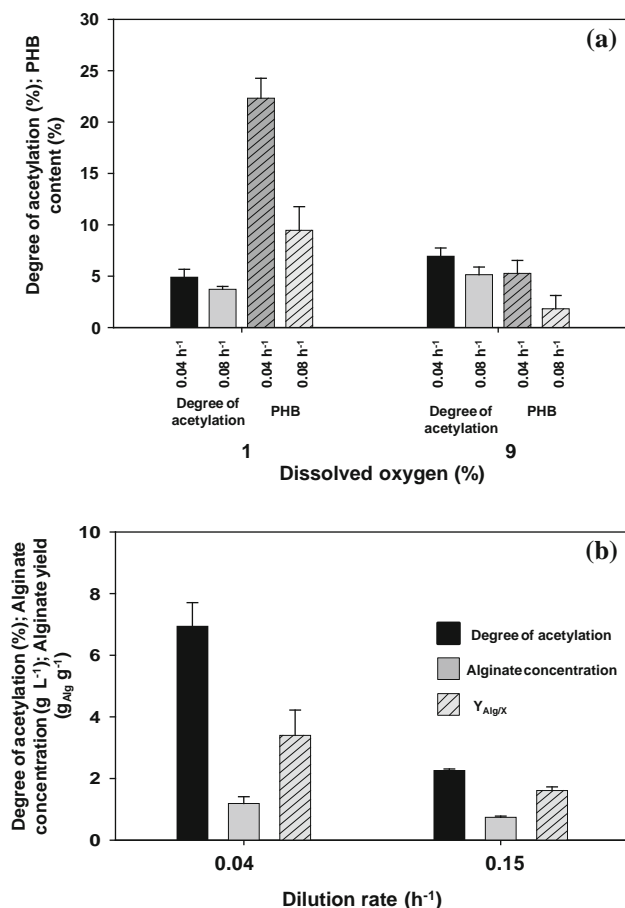


**Fig. 4** Steady-state alginate concentration (a), alginate yield based on total biomass (b), and degree of alginate acetylation (c) for cultivations at 1 % (filled diamond) and 9 % (filled square) of DO

*algA*, *algC*, and *algD* and the activities of their encoded enzymes (the bifunctional enzyme phosphomannose isomerase/guanosine diphosphomannose pyrophosphorylase, the phosphomannomutase, and the GDP-mannose dehydrogenase, respectively) were up-regulated by increases in oxygen concentration within a range of 0–10 % DO.

#### Effect of the specific growth rate

The acetylation degree was also affected by the dilution rate ( $\mu$ ) (Fig. 5b). The highest values were achieved at a very low  $D$  ( $0.04 \text{ h}^{-1}$ ). This is highly relevant because, even though the behavior of *A. vinelandii* in chemostat cultivations has been widely studied, in general, the values of  $D$  evaluated by other authors were higher than  $0.05 \text{ h}^{-1}$  [1, 6, 8, 12, 14, 26]. Previously, Annison and Couperwhite [1] evaluated alginate acetylation in chemostat cultures of *A. vinelandii* at different values of  $D$ . In contrast to the



**Fig. 5** Degree of alginate acetylation and PHB content at 1 and 9 % DO for  $D = 0.04$  and  $0.08 \text{ h}^{-1}$  (a); degree of alginate acetylation, alginate concentration and alginate yield based on biomass at  $0.04$  and  $0.15 \text{ h}^{-1}$  for cultivations at 9 % DO (b)

results found in the present study, those authors observed that the acetylation degree of alginates increased a high dilution rate ( $0.32 \text{ h}^{-1}$ ). However, the conditions and experimental range reported by Annison and Couperwhite [1] were considerably different to those used in the present study. Firstly, a strict control of DO at 1 and 9 % DO was achieved in our study; while in the mentioned study, the DO oscillated between 20 and 30 %. Another important difference was the range of  $D$  evaluated; Annison and Couperwhite [1] tested values of  $D$  of 0.16, 0.18, and  $0.32 \text{ h}^{-1}$ , in contrast to the present study in which the range of  $D$  evaluated was lower ( $0.02\text{--}0.15 \text{ h}^{-1}$ ).

It should be emphasized that the highest values for alginate acetylation were achieved under low dilution rates, mainly at 9 % DO, correlating with the increase in the alginate yields observed under such conditions (Fig. 5b). Previously, other authors have reported that the highest alginate yields ( $Y_{\text{Alg}/X}$  and  $Y_{\text{Alg}/G}$ ) were obtained at low values of  $\mu$  in cultivations of the *A. vinelandii* mutant strain

**Table 2** Carbon usage

DOT (%)	$D$ ( $\text{h}^{-1}$ )	% C-mol <sub>Alg</sub>	% C-mol <sub>Acetyl</sub>	% C-mol <sub>Biomass</sub>	% C-mol <sub>PHB</sub>	% C <sub>used</sub>
1	0.04	19.5	1.5	14.2	3.8	38.9
	0.08	17.6	1.0	17.2	1.7	37.5
9	0.04	25.7	2.8	9.3	0.5	38.2
	0.08	18.8	1.5	14.9	0.3	35.5

For the calculation of each % C-mol, the following considerations were done:  $24.6 \text{ g}_{\text{CDW}} = 1\text{C-mol}$  for % C-mol<sub>biomass</sub>;  $26.0 \text{ g}_{\text{Hydroxybutiric acid}} = 1\text{C-mol}$  for % C-mol<sub>PHB</sub>;  $32.3 \text{ g}_{\text{Mannuronic}} = 1\text{C-mol}$  for % C-mol<sub>Alg</sub>;  $21.5 \text{ g}_{\text{Acetyl}} = 1\text{C-mol}$  for % C-mol<sub>Acetyl</sub>.

SML2 using exponential, fed-batch cultivations [24], and in chemostat cultivations of *Pseudomonas mendocina* [27]. In *A. vinelandii*, alginate production is involved in cyst formation under desiccation conditions in which nutrient limitations are occurring and therefore very low specific growth rates might be obtained. The results obtained in the present study support the hypothesis that low specific growth rates may have an important role in alginate biosynthesis. Although the regulation of alginate biosynthesis is a complex process that is not completely understood, it is well known that alginate biosynthesis could be positively regulated at the gene expression level by sigma factors such AlgU and RpoS [18]. The latter is a central regulator present during the stationary growth phase (in which growth rates are close to zero) in bacteria, and it also participates in transcriptional regulation of the PHB biosynthetic genes (*phbBAC*) [11], in agreement with the increased PHB accumulation observed at the lowest dilution rates at 1 % DO.

## Conclusions

It has been demonstrated in glucose-limited chemostat cultivations of *A. vinelandii*, that DO and  $\mu$  determine the degree of acetylation of alginates produced by this bacterium. Changes on DO and  $\mu$  affect the carbon fluxes used for respiration and PHB production and indirectly the degree of acetylation of alginates, suggesting that alginate acetylation is highly dependent of the acetyl-CoA availability. In addition, alginate acetylation was also affected by the alginate biosynthetic process, showing that the increased alginate acetylation correlated with increased alginate yields.

**Acknowledgments** Financial support of DGAPA-UNAM (grant IN110310-3). PhD grant of Tania Castillo from CONACYT. The authors acknowledge the helpful discussions with Dr. Cinthia Núñez and Dr. Álvaro Lara.

**Conflict of interest** The authors declare that they have no competing interests.

## References

1. 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
2. Augst AD, Kong HJ, Mooney DJ (2006) Alginate hydrogels as biomaterials. *Macromol Biosci* 6:623–633
3. Chang W-S, Van de Mortel M, Nielsen L, Nino de Guzmán G, Li X, Xalverson LJ (2007) Alginate production by *Pseudomonas putida* creates a hydrated microenvironment and contributes to biofilm architecture and stress tolerance under water-limiting conditions. *J Bacteriol* 189(22):8290–8299
4. Cheetham NWH, Punruckvong A (1985) An HPLC method for the determination of acetyl and pyruvyl groups in polysaccharides. *Carbohydr Polym* 5:399–406
5. Clarke AJ, Strating H, Blackburne NT (2000) Pathways for the *O*-acetylation of bacterial cell wall polysaccharides. In: Ron J (ed) *Glycobiology* published on line. Doyle. doi:10.1007/b113570
6. Díaz-Barrera A, Silva P, Berrios J, Acevedo F (2010) Manipulating the molecular weight of alginate produced by *Azotobacter vinelandii* in continuous cultures. *Biores Technol* 101:9405–9408
7. Díaz-Barrera A, Aguirre A, Berrios J, Acevedo F (2011) Continuous cultures for alginate production by *Azotobacter vinelandii* growing at different oxygen uptake transfer rates. *Proc Biochem* 46:1879–1883
8. Díaz-Barrera A, Soto E, Altamirano C (2012) Alginate production and *alg8* gene expression by *Azotobacter vinelandii* in continuous cultures. *J Ind Microbiol Biotechnol* 39:613–621
9. Draget KI, Taylor C (2011) Chemical, physical and biological properties of alginates and biomedical implications. *Food Hydrocolloids* 25:251–256
10. Galindo E, Peña C, Núñez C, Segura D, Espín G (2007) Molecular and bioengineering strategies to improve alginate and polyhydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii*. *Microb Cell Fact* 6:7
11. Hernández-Eligio A, Castellanos M, Moreno S, Espín G (2011) Transcriptional activation of the *Azotobacter vinelandii* polyhydroxybutyrate biosynthetic genes *phbBAC* by *PhbR* and *RpoS*. *Microbiol* 157:3014–3023
12. Horan NJ, Jarman TR (1983) Studies on some enzymes of alginic acid biosynthesis in *Azotobacter vinelandii* grown in continuous culture. *J Gen Microbiol* 129:2985–2990
13. Jackson FA, Dawes EA (1976) Regulation of the tricarboxylic acid cycle and poly- $\beta$ -hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii* grown under nitrogen or oxygen limitation. *J Gen Microbiol* 97:303–312
14. Kuhla J, Oelze J (1988) Dependency of growth yield, maintenance and  $K_s$ -values on the dissolved oxygen concentration in continuous cultures of *Azotobacter vinelandii*. *Arch Microbiol* 149:509–514
15. Leitao JH, Sá-Correia I (1997) Oxygen-dependent upregulation of transcription of alginate genes *algA*, *algC* and *algD* in *Pseudomonas aeruginosa*. *Res Microbiol* 148:37–43
16. Lozano E, Galindo E, Peña C (2011) Oxygen transfer rate during the production of alginate by *Azotobacter vinelandii* under oxygen-limited and non oxygen-limited conditions. *Microb Cell Fact* 10:13
17. Nivens DE, Ohman DE, Williams J, Franklin M (2001) Role of alginate and its acetylation in formation of *Pseudomonas aeruginosa* microcolonies and biofilms. *J Bacteriol* 183(3):1047–1057
18. Núñez C, Peña C, Kloeckner W, Hernández-Eligio A, Bogachev A, Moreno S, Guzmán J, Büchs J, Espín G (2013) Alginate synthesis in *Azotobacter vinelandii* is increased by reducing the intracellular production of ubiquinone. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:2503–2512
19. Ombaka EA, Cozens RM, Brown RW (1983) Influence of nutrient limitation of growth on stability and production of virulence factors of mucoid and nonmucoid strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Rew Infect Dis* 5(5):880–888
20. Peña C, Trujillo-Roldán M, Galindo E (2000) Influence of dissolved oxygen tension and agitation speed on alginate production and its molecular weight in cultures of *Azotobacter vinelandii*. *Enzyme Microb Technol* 27:390–398
21. Peña C, Hernández L, Galindo E (2006) Manipulation of the acetylation degree of *Azotobacter vinelandii* alginate by supplementing the culture medium with 3-(*N*-morpholino)-propane-sulfonic acid. *Lett Appl Microbiol* 43:200–204
22. Peña C, Galindo E, Büchs J (2011) The viscosifying power, degree of acetylation and molecular mass of the alginate produced by the oxygen transfer rate. *Proc Biochem* 46:290–297
23. Peña C, Castillo T, Núñez C, Segura D (2011) Bioprocess design: fermentation strategies for improving the production of alginate and poly  $\beta$  hydroxyalkanoates (PHAs) by *Azotobacter vinelandii*. INTECH- Open Access Publisher, London, pp 217–242
24. Priego-Jiménez R, Peña C, Ramírez O, Galindo E (2005) Specific growth rate determines the molecular mass of the alginate produced by *Azotobacter vinelandii*. *Biochem Eng J* 25:187–193
25. Sabra W, Zeng A-P, 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 microaerobic conditions. *Appl Microbiol Biotechnol* 52:773–780
26. Sabra W, Zeng A-P, Lunsdorf H, Deckwer W-D (2000) Effect of oxygen on formation and structure of *A. vinelandii* alginate and its role in protecting nitrogenase. *Appl Environ Microbiol* 66(9):4037–4044
27. Sengha S, Anderson AJ, Hacking AJ, Dawes EA (1989) The production of alginate by *Pseudomonas mendocina* in batch and continuous culture. *J Gen Microbiol* 135:795–804
28. Senior PJ, Beech GA, Ritchie GAF, Dawes EA (1972) The role of oxygen limitation in the formation of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate during batch and continuous culture of *Azotobacter beijerinckii*. *Biochem J* 128:1193–1201
29. Senior PJ, Dawes EA (1973) The regulation of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. *Biochem J* 134:225–238
30. Skjak-Braek G, Grasdalen H, Larsen B (1986) Monomer sequence and acetylation pattern by some bacterial alginates. *Carbohydr Res* 154:239–250
31. Skjak-Braek G, Zanetti F, Paoletti S (1989) Effect of acetylation on some solution and gelling properties of alginates. *Carbohydr Res* 185:131–138
32. Straathman A, Windhues T, Borchard W (2004) Effects of acetylation on thermodynamic properties of seaweed alginate in sodium chloride solutions. *Prog Colloid Poly Sci* 127:26–30
33. Tielen P, Strathmann M, Jaeger K-E, Flemming C, Wingeder J (2005) Alginate acetylation influences initial surface colonization by mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Res* 160:165–176
34. Vázquez A, Moreno S, Guzmán J, Alvarado A, Espín G (1999) Transcriptional organization of the *Azotobacter vinelandii* *algXLVIFA* genes: characterization of *algF* mutants. *Gene* 232:217–222
35. Windhues T, Borchard W (2003) Effect of acetylation on physico-chemical properties of bacterial and algal alginates in

- physiological sodium chloride solutions investigated with light scattering techniques. *Carbohydr Polym* 52:47–52
36. Worlitzch D, Tarran R, Ulrich M, Schwab U, Cekici A, Meyer K, Birrer P, Bellon G, Berger J, Weiss T, Botzenhart K, Jankaskas JR, Randell S, Boucher RC, Döring G (2002) Effects of mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas infections* of cystic fibrosis patients. *J Clin Invest* 109(3):317–325

### 3. CAPÍTULO DE LIBRO

Peña C, **Castillo T**, Núñez C and Segura D: **Bioprocess design: fermentation strategies for improving the production of alginate and poly  $\beta$  hydroxyalkanoates (PHAs) by *Azotobacter vinelandii***. In: Progress in molecular and environmental bioengineering from analysis and modelling to technology applications. 2011. editor. Angelo Carpi. Intech open ISBN: 978-953-307-268-5 pp: 217-242 [www.intechopen.com](http://www.intechopen.com).

# **Bioprocess Design: Fermentation Strategies for Improving the Production of Alginate and Poly- $\beta$ -Hydroxyalkanoates (PHAs) by *Azotobacter vinelandii***

Carlos Peña, Tania Castillo,  
Cinthia Núñez and Daniel Segura  
*Instituto de Biotecnología,  
Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)  
México*

## **1. Introduction**

Industrial interest in microbial polymers has been stimulated by their unique properties and the opportunity to develop new materials, which can be used for specific applications in medical and pharmaceutical industries. *Azotobacter vinelandii* produces two polymers of biotechnological importance; alginate, an extracellular polysaccharide, and poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB), an intracellular polyester of the polyhydroxyalkanoates (PHAs) family (Galindo et al., 2007). Alginates are linear polysaccharides composed of variable amounts of (1-4)- $\beta$ -D-mannuronic acid and its epimer,  $\alpha$ -L-guluronic acid. Alginates present a wide range of applications, acting as stabilizing, thickening, gel or film-forming agents, in various industrial fields. Currently, new applications are being discovered for these polymers, such as their use as a source of soluble fiber, or in medical products. One example is found in the use of alginate gel beads as entrapment devices for transplantation of e. g. insulin producing cells and tissue engineering (Hernández et al., 2010).

The intracellular polyester PHB and other PHAs have been drawing attention because they are biodegradable and biocompatible thermoplastics, which can be processed to create a wide variety of consumer products, including plastics, films, and fibers (Aldor & Keasling, 2003). Recently, and based on their properties of biocompatibility and biodegradability, new attractive applications for PHAs have been proposed in the medical field, where the chemical composition and product purity are critical (Williams & Martin, 2005).

The subjects covered in this chapter include research concerning the production of alginate and PHB by *A. vinelandii*, particularly the molecular regulation of the production of these polymers, the influence of fermentation parameters on the production and composition of alginate and PHB, some reports about the scaling-up of the process and downstream processing, and finally, novel fermentation strategies that could be applied for the production of alginate and PHAs by *A. vinelandii*.

## 2. Structure and physical properties of alginate and PHAs

Alginates are polysaccharides constituted by variable amounts of  $\beta$ -D-mannuronic acid and its C5-epimer  $\alpha$ -L-guluronic acid linked by 1-4 glycosidic bonds (Figure 1). The monomers are distributed in blocks of continuous mannuronate residues (M), guluronate residues (G) or alternating residues (MG) (Smidsrod & Draget, 1996). *Azotobacter* alginates are true block co-polymers, composed of homopolymeric regions of M and G residues, separated by regions of alternating structure (Clementi, 1997). Unlike alginates produced by algae, bacterial alginates are acetylated to a variable extent at positions O-2 and/or O-3 of the mannuronate residues (Skjak-Braek et al., 1986). The variability in molecular mass, monomer block structure and acetylation influence the physicochemical and rheological characteristics of the polymer.

The capability of alginate to confer viscosity in solution is dependent on its molecular mass (MM). The MM of algal alginates has been found to range from 48 to 186 kDa (Donnan & Rose, 1950). In contrast, some alginates isolated from *A. vinelandii* present MM in the range of 80 to 4,000 kDa (Galindo et al., 2007).

The gelling properties of alginate are based on the affinity of the molecule towards certain ions, especially  $\text{Ca}^{++}$ , and the ability to bind these ions selectively and cooperatively. Selective ion binding is related to the content of G residues, in particular the length of the G-blocks. Alginates rich in G residues show an increased ionic binding, resulting in enhanced mechanical rigidity (Grant et al., 1973). Alginates with a low M/G ratio form strong and brittle gels, while alginates with a high M/G ratio form weaker and softer, but more elastic gels (Skjak-Braek et al., 1986).

Bacterial alginates which are O-acetylated, have a polyelectrolyte behaviour different from that of the non-acetylated algal alginates. This is because acetyl groups strongly perturb stereoregular sequences and produce significant conformational effects. In addition, the presence of acetyl groups diminishes the binding capacity and the selectivity coefficient for cations, affecting the gelling properties of alginate. The presence of O-acetyl groups in bacterial alginates might represent an advantage for certain applications, as it has been demonstrated that they improve the viscosity and enhance the swelling ability of the polymer (Clementi, 1997; Peña et al., 2006).

On the other hand, polyhydroxyalkanoates (PHAs) are aliphatic polyesters generally composed of  $\beta$ -hydroxy fatty acid monomers in which the carboxyl group of one monomer forms an ester bond with the hydroxyl group of the neighboring monomer (Madison & Huisman, 1999; Figure 1). The MM of PHAs is dependent on the bacterial species used and culture conditions but is generally on the order of 50 to 1,000 kDa (Madison & Huisman, 1999). At present, more than 150 different hydroxyalkanoate constituents have been reported in PHAs, as homopolyesters or as copolyesters (Steinbuechel & Lutke-Eversloh, 2003). These highly diverse polymers can be classified according to the size of the comprising monomers. PHAs containing monomers with C4–C5 atoms are categorized as short-chain-length PHAs (scl-PHAs). In contrast, medium-chain-length PHAs (mcl-PHAs) are composed of C6–C14  $\beta$ -hydroxy fatty acids (Lee, 1996). Most bacteria synthesize either scl-PHAs or mcl-PHAs (Madison & Huisman, 1999). scl-PHAs have properties close to conventional plastics, while the mcl-PHAs are regarded as elastomers and rubbers (Suriyamongkol et al., 2007).

Polyhydroxybutyrate (PHB) is the more abundant PHA and has been studied extensively. This polymer has some mechanical properties similar to conventional plastics like

polypropylene or polyethylene, although it is highly crystalline and stiff, leading to brittleness and low elongation to break (Khanna & Srivastava, 2005). Initial biotechnological developments were aimed at making PHAs easier to process. Because the monomeric composition of a PHA is crucial for its mechanical properties, the incorporation in the PHB polymer of secondary monomer units(s) such as  $\beta$ -hydroxyvalerate (3HV) improves the characteristics of the material obtained. For example, a random copolymer of 3HB and 3HV is more ductile, easier to mold, and tougher than PHB homopolymer (Taguchi & Doi, 2004), and it can be used to prepare films with excellent water and gas barrier properties reminiscent of polypropylene, and can be processed at a lower temperature while retaining most of the other mechanical properties of PHB.

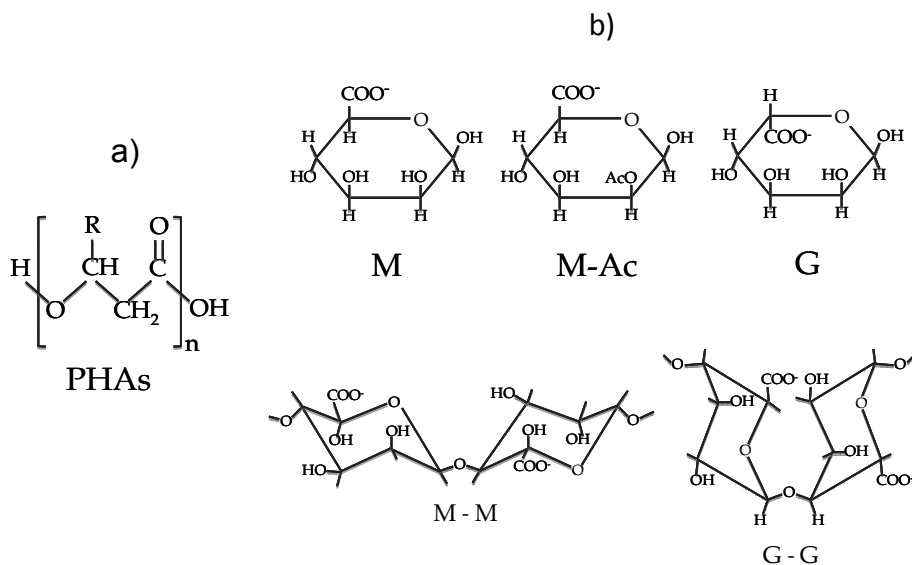


Fig. 1. Chemical structure of PHAs (a) and Alginate (b). M, mannuronic acid; G, guluronic acid; Ac, acetyl. R, alkyl group.

### 3. Novel applications of alginate and PHAs

#### 3.1 Novel applications of alginates

Novel alginate applications have been focused on pharmaceutical and biomedical fields, because they are non-toxic, biocompatible, non-immunogenic, hydrophilic and biodegradable material (Augst et al., 2006; Hernández et al., 2010). Alginate hydrogels can be used as bulking materials for *in vivo* and *in vitro* cell immobilization, like drug controlled delivery system, for tissue engineering (Augst et al., 2006; Hernández et al., 2010), and alginate conjugates have also been tested as antigens to control cystic fibrosis (Kashef et al., 2006), and other bacterial infections (H. Sun et al., 2007). During the last three decades, microencapsulation using alginate has been investigated to deliver and protect from the host immune system, not only drugs, but also transplanted cells (Hoesli et al., 2011). The materials used for these molecular/cell immobilization require to be biocompatible and bio-inert, with certain size and shape. In addition, alginates have been used as scaffold for tissue



engineering, and chemical modifications that increase alginate biocompatibility or cell adhesion have been developed. The polysaccharide can be modified by coupling proteins and peptides, allowing the control of cell attachment (Augst et al., 2006; Hernández et al., 2010). The biomimetic gel design provides *in vivo* long-term functionality and higher mechanical stability (Hernández et al., 2010).

Some therapeutic applications of alginate microencapsulation are related with drug delivery. For low-molecular weight drugs, regulating drug-alginate interactions in alginate gels allows the control of drug release. This is especially important for drugs that have severe side effects, like antineoplastic agents. Besides, some proteins with therapeutic activities can be alginate-microencapsulated to improve their efficacy and targeting, because alginate encapsulation facilitate a localized delivery without adverse side effects. Alginate microencapsulation has been proven with basic fibroblast growth factor (bFGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF). The release of VEGF is controlled by the dissolution of the ionic binding complex between alginate and VEGF and subsequent diffusion, showing a constant release rate for several weeks (Augst et al., 2006).

Alginate has been successfully used for cell microencapsulation, which is of great importance for Diabetes Mellitus type 1 treatment, where several efforts have been made for regulated insulin supply for treating insulin-dependent patients (Hernández et al., 2010). Moreover, there are several new strategies developed to improve the cell-alginate immobilization process (Hoesli et al., 2011), as well as immune protection and oxygen supply to avoid hypoxia problems during transplants (Ludwig et al., 2010). In the tissue engineering field, alginate has been used for bone regeneration therapy using co-immobilization of human osteoprogenitors and endothelial cells in studies *in vivo* and *in vitro* (Hernández et al., 2010). Other important applications of alginate for tissue engineering are related to neurological and cardiologic tissue regeneration (Hernández et al., 2010).

*Pseudomonas aeruginosa* is the most common pathogen responsible for morbidity and mortality in cystic fibrosis patients. During infection, this bacterium produces alginate, which is an important virulence factor (Kashef et al., 2006). For this reason, alginate has been used for vaccine design, against *P. aeruginosa*. Vaccines based on purified alginate bring poor immunogenicity (Dörig & Pier, 2008); however, when alginate is conjugated with proteins, the immune response could be enhanced (Dörig & Pier, 2008; Kashef et al., 2006). Kashef et al., (2006) designed an alginate-tetanus toxoid conjugate non-toxic, non pyrogenic, which was able to protect mice against a lethal dose of mucoid *P. aeruginosa*. It is important to point out that alginate viscosity plays an important role for the *P. aeruginosa* protection during the infection process. Because of this, it has been proposed to induce changes in the rheology of the alginate by addition of alginate oligoelectrolytes conformed by G blocks only (Draget & Taylor, 2011). These oligoguluronates reduce the mechanical response of the polymer synthesized by *P. aeruginosa* in patients diagnosed with cystic fibrosis (Draget & Taylor, 2011).

Alginates have also been studied for development of novel immunotherapy strategies for cancer treatment using dendritic cells which are potent initiators of immune response. Calcium cross-linked alginate gels carrying dendritic cells initiated the immune response and allowed the migration of the immune cells through the alginate gel (Hori et al., 2008, 2009).

### 3.2 Novel applications for PHAs

PHAs have received much attention as candidates to produce biodegradable plastics compatible with the environment, due to their material properties (similar to those of well-

known plastics such as polypropylene), their production from renewable sources, and their inherent biodegradability in various environments (Taguchi & Doi, 2004). These biopolyesters are attractive to replace non-biodegradable plastics, especially for those products that usually have single-use applications, such as food packaging.

Material	Application	Desirable properties	Reference
Alginate	Drug delivery	Gel formation/ Biocompatible/ Bioinert/ Biodegradable/ Drug alginate interaction	Augst et al., 2006
	Cell immobilization	Gel formation/ Biocompatible/ Bioinert/ Diffusion	Hernández et al., 2010 Hoesli et al., 2011
	Tissue Engineering	Gel formation/ Biocompatible/ Bioinert/Diffusivity	Hernández et al., 2010
	Vaccines against <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Immunogenicity	Kashef et al., 2006
	Mucus alteration	Low Viscosity	Draget & Taylor, 2011
	Cancer therapy	Gel formation/ Biocompatible/ Bioinert/ Diffusivity	Hori et al., 2008
PHA	Bioplastics	Thermoplasticity, physical and mechanical resistance/ Biodegradable	Chen, 2009
	Tissue Engineering	Thermoplasticity, physical and mechanical resistance/ Biocompatible	Wu et al., 2009 Grage et al., 2009
	Drug delivery	Biocompatible/ Biodegradable	Chen, 2009
	Cell microencapsulation and nanoencapsulation	Biocompatible/ Biodegradable	Grage et al., 2009
	Affinity support	Biocompatible	Lee et al., 2005 Wang et al., 2008
	Affinity chromatography Biomarkers/ Biosensors	Biocompatible	Grage et al., 2009
	Biofuels	Biodegradability/ Methyl esterification capability	Zhang et al., 2009

Table 1. Novel applications of Alginate and PHAs.

Some of the monomers present in PHAs are known to be present in human and animals. For example, the monomeric component of PHB ( $\beta$ -hydroxybutyrate) is a ketone body normally found in human blood (Williams & Martin, 2005). The biocompatibility, together with the adjustable mechanical properties, and controllable biodegradability of PHAs have raised interesting applications in the medical field. These polymers have been used in artificial organ construction, drug delivery, tissue repair, and nutritional/therapeutic uses (Chen & Wu, 2005; Freier, 2006; Grage et al., 2009; Valappil et al., 2006; Williams & Martin, 2005; Wu et al., 2009; Zinn et al., 2001). Because several PHAs are available now in sufficient quantity, some of them have been used in biocompatibility studies *in vivo* (Valappil et al., 2006). Some of the medical devices tested with different degrees of success include meniscus repair devices, staples, screws, bone plating systems, cardiovascular patches, stents and nerve guides (Wu et al., 2009).

Very interesting applications for PHAs are found in the fabrication of drug delivery devices. Their biocompatibility, combined with their biodegradation, make them good candidates for this purpose (Chen, 2009). The possibility to create PHAs of various monomeric compositions and molecular weights makes possible the fine control of their degradation rate (Wu et al., 2009). Several drugs have been entrapped or microencapsulated in PHA homopolymers or copolymers, such as, anticancer agents, antihypertensives, hormones, vaccines, etc. (Williams & Martin, 2005).

More recently, new applications have been reported for PHAs, not just as a material but for the PHA granules themselves as micro-nano beads, resulting in applications for protein purification and specific drug delivery (Grage et al., 2009). Affinity protein purification methods make use of an affinity tag fused to the protein of interest. The interaction of the tagged protein with an immobilizing matrix allows the separation of the protein. PHA granules have been used as an inexpensive affinity support, while the phasins, PHA synthase, or PHA depolymerase, proteins naturally associated with the granules, work as the affinity tag for the purification or immobilization of proteins (Lee et al., 2005; Wang et al., 2008). Combining the fusion of the protein of interest with the phasin protein (PhaP), intein mediated self-cleavage, and PHA synthesis in recombinant *Escherichia coli*, specific proteins can be produced together with their insoluble matrix, and after cell disruption, precipitation and self-cleavage, the purified protein is released (Banki et al., 2005; Mee et al., 2008). A similar method using *Cupriavidus necator* instead of *E. coli* has been developed (Barnard et al., 2005).

PHA nanoparticles have also been used in drug delivery, target specific therapy and as biomarkers or biosensors (Grage et al., 2009). Using the same principle of affinity binding of PHA synthase to PHA granules, Brockelbank et al., (2006) demonstrated the display of antigen fragments at the surface of PHA beads, showing their potential to be used in immunoglobulin G (IgG) purification from human serum. The functional display of antigen or antibodies fragments at the bead surface can be used for diagnostic or therapeutic applications (Grage et al., 2009). Fusion of PHA synthase with streptavidin has shown that these PHA beads can also be used for ELISA, DNA purification, enzyme immobilization and flow cytometry (Peters & Rhem, 2008). Engineered proteins for inorganics, like gold or silica, or IgG, have also been fused to the PHA synthase, and displayed at the surface of PHA granules, so these biobeads can be used for medical bioimaging procedures as inorganic contrast agents (Grage et al., 2009; Jahns et al., 2008).

With respect to targeted drug delivery, Yao et al., (2008) demonstrated that phasins can be fused to ligands recognized by tissue specific receptors, and that the ligand-PhaP-nanobeads are taken up by the correct tissue *in vivo*, delivering drugs loaded in the PHA beads.

Other applications for PHAs include their use as fine chemicals. A high diversity of carboxylic acids, all in the (R)- configuration, can be obtained by depolymerization or by chemical degradation of PHAs, and these can be bulk chemicals for various applications (Chen, 2009). Some of them have been used as starting material for the synthesis of antibiotics, vitamins, aromatics and pheromones (Ruth et al., 2007).

A new field of application for PHAs has been devised in the energy industry. These polymers can be used as biofuels (Chen, 2009). The conversion of PHB or mcl-PHAs to their methyl ester derivatives by acid catalyzed hydrolysis, allowed their use as fuels in blends with ethanol, gasoline, and diesel, with reasonable combustion heats (Zhang et al., 2009).

#### 4. *Azotobacter vinelandii*

*A. vinelandii* is a gamma Proteobacteria having a strictly respiratory type of metabolism with oxygen as the terminal electron acceptor. Nitrogen is fixed at either microaerobic or fully aerobic conditions. Its growth is heterotrophic where sugars, alcohols and salts of organic acids are used as carbon source (Kennedy et al., 2005). Sugars are metabolized through the Entner-Doudoroff pathway (Conway, 1992). The genus *Azotobacter* is distinguished by the ability to form metabolically dormant cyst in stationary phase or upon induction of vegetative cells with 0.2% of n-butanol. The cysts are significantly more resistant than vegetative cells to desiccation (Socolofsky & Wyss, 1962). Alginate is a component of the envelope that protects the cyst, and is essential for the resistance to desiccation (Campos et al., 1996). Upon induction of encystment intracellular accumulation of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) occurs at an exponential rate; however recent data demonstrated that PHB was not essential for the formation of mature cysts (Segura et al., 2003a).

The majority of nitrogen fixing bacteria are capable of reducing  $N_2$  only in anaerobic or microaerobic conditions. In contrast, *A. vinelandii* is an obligate aerobe capable of fixing  $N_2$  even at high concentration of  $O_2$ . This is possible because this bacterium can adjust oxygen consumption rates to help maintain low levels of cytoplasmic oxygen, which is otherwise detrimental not only for nitrogenase, but also to other oxygen-sensitive enzymes, a process that has been called respiratory protection (Poole & Hill, 1997). In addition to the respiratory protection of the nitrogenase, another way to keep the cytoplasm anaerobic is to prevent the  $O_2$  transfer into the cell. The polysaccharide alginate is believed to form a coating around the cell, acting as a physical  $O_2$  barrier (Sabra et al., 2000). This barrier has also been reported to protect the cell from heavy metals toxicity, as an ion-exchange system with high affinity to  $Ca^{++}$ , or to provide a negatively charge coating which creates a barrier against attack and adverse environmental conditions (Clementi, 1997).

#### 5. Genetics and biosynthesis of alginates and PHAs in *A. vinelandii*

##### 5.1 Biosynthesis of alginates by *A. vinelandii*

The pathway for alginate synthesis has been well established and it is conserved among brown algae, *Pseudomonas* and *Azotobacter* spp. (Lynn & Hassid, 1966; Pindar & Bucke, 1975). Fructose 6-P, the precursor of this metabolic pathway, is converted by four enzymatic reactions to GDP-mannuronic acid (for a detailed review see Galindo et al., 2007; Remminghorst & Rehm 2006). Polymerization of GDP-mannuronic acid is conducted by an inner membrane mannuronate polymerase (Alg8) and its activity is regulated by another inner membrane protein (Alg44), essential for alginate biosynthesis (Galindo et al., 2007).

The resultant poly-mannuronic acid is then modified by a periplasmic *O*-acetylase complex (AlgI, AlgV, AlgF) and some of the non-acetylated mannuronate residues are epimerized to guluronate by a periplasmic mannuronate epimerase (AlgG). The polymer is then exported through the outer membrane via the pore-forming protein AlgJ where the activity of several extracellular C-5 epimerases (AlgE1-7), present only in *A. vinelandii* generate alginates with different amounts of alternating structures and/or G-block lengths (Ertesvag et al., 1999). The molecular factors determining the molecular mass of the alginate remain largely unknown, but it has been suggested that it is the result of the polymerase and/or lyase activities on the polymer. In *A. vinelandii*, the existence of five alginate lyases showing different sequence cleavage specificity and cellular locations have been reported (Gimmestad et al., 2009; Trujillo-Roldán et al., 2003). The periplasmic AlgL protein is involved in the biosynthesis of the polysaccharide, while the extracellular AlgE7 (a bi-functional alginate lyase and C-5 epimerase) and AlyA3 enzymes are involved in the release of the polymer from the cell surface and in the rupture of the cyst coat during germination, respectively. The function of the lyases AlyA1 and AlyA2 remains unknown. However, AlyA2 activity was shown to be essential for vegetative growth (Gimmestad et al., 2009). The *algD* gene encodes the key enzyme catalyzing the generation of the alginate monomer GDP-mannuronic acid (for a recent review see Galindo et al., 2007). Expression of *algD* is highly controlled by several global regulators such as the stress response sigma factor AlgU and the signalling transduction cascade conformed by the two-component system GacA/GacS and the stationary growth phase sigma factor RpoS protein, which also positively control PHB synthesis (Castañeda et al., 2000; 2001). *A. vinelandii* mutants have been constructed with the aim of generating alginates with different physicochemical properties. An *algL* mutant was shown to produce an alginate with a molecular mass higher than that of the wild type strain (Trujillo-Roldan et al., 2003). Furthermore a mutation in the *algF* gene, encoding one of the subunits of the *O*-acetylase complex, resulted in the production of a non-acetylated alginate, similar to that of algal origin (Vazquez et al., 1999). As the polymers PHB and alginate compete for the supplied carbon source we generated mutants with a total blockade in PHB synthesis and in which the production of alginate was increased several fold. The contrary was also true for the production of PHB as a total blockade in the synthesis of alginate increased the accumulation of PHB (Segura et al., 2003b).

## 5.2 Biosynthesis of PHAs by *A. vinelandii*

PHB in *A. vinelandii*, as in most bacteria, is synthesized in three steps from acetyl-CoA (Figure 2; Manchak & Page 1994).  $\beta$ -Ketothiolase catalyzes the first reaction, i.e. the condensation of two molecules of acetyl-CoA to form acetoacetyl-CoA. This product is subsequently reduced by an NADPH dependent acetoacetyl-CoA reductase to stereoselectively produce (R)- $\beta$ -hydroxybutyryl-CoA. Finally, PHB synthase catalyzes the polymerization of (R)- $\beta$ -hydroxybutyryl-CoA releasing free CoA.

In *A. vinelandii*, the genes coding for these enzymes are contained in the PHB biosynthetic operon *phbBAC*, which codes for the acetoacetyl-CoA reductase,  $\beta$ -ketothiolase, and PHB synthase respectively (Peralta-Gil et al., 2002; Segura et al., 2000, 2003a). In the same DNA region, other genes related to PHB synthesis were also found: *phbR*, which codes for a transcriptional regulator; *phbP*, a putative granule-associated protein; and *phbF*, a putative regulator of *phbP* (Peralta-Gil et al., 2002; Segura et al., 2003a).

When *A. vinelandii* UWD is grown on medium supplemented with n-alkanoates, such as valerate, heptanoate or nonanoate, a copolymer of poly(Hydroxybutyrate-Co-Hydroxyvalerate) (PHBV) is synthesized (Page et al., 1992). The recent analysis of the *A. vinelandii* genome sequence (Setubal et al., 2009) demonstrated the presence of *phaJ*, a gene coding for a (D)-specific enoyl-Coenzyme A hydratase that is responsible for the channeling of enoyl-CoA derivatives from the fatty acid oxidation pathway to PHAs synthesis in several pseudomonads (Fukui et al., 1998). Thus, this enzyme would be producing the hydroxyvalerate precursors for PHBV synthesis in *A. vinelandii* (Figure 2).

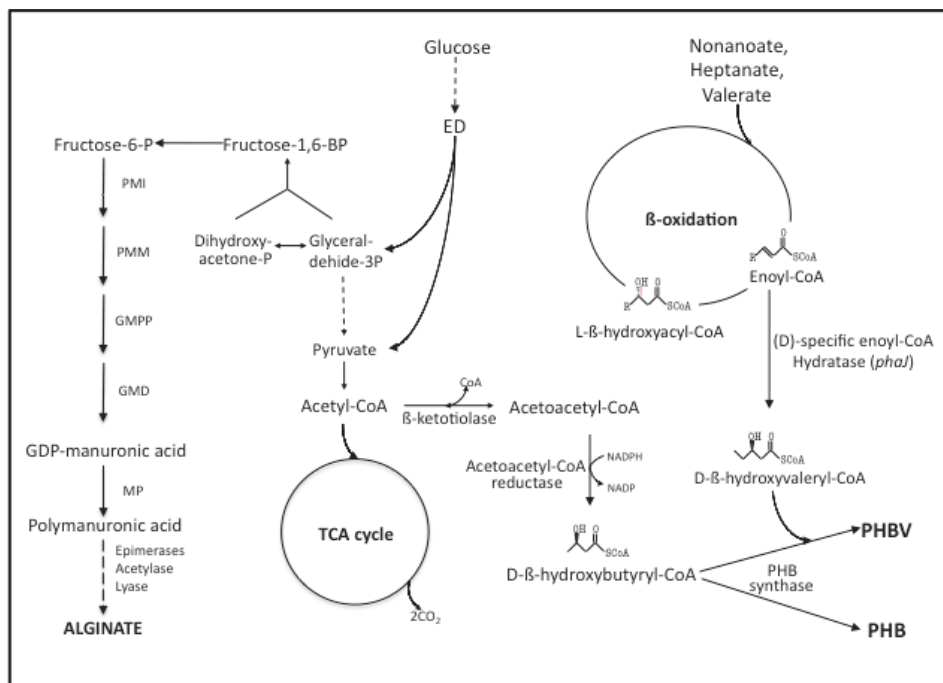


Fig. 2. Metabolic pathways involved in the synthesis of alginate and PHAs in *A. vinelandii*. PMI, phosphomannose isomerase; PMM, phosphomannose mutase; GMPP, guanosine diphosphomannose pyrophosphorylase; GMD, GDP-mannose dehydrogenase; MP, mannuronate polymerase; ED, Entner-Doudoroff pathway.

The control of PHB biosynthesis in *Azotobacter* was one of the first to be studied (Senior et al., 1972; Senior & Dawes, 1971, 1973). The main condition triggering PHB synthesis is oxygen limitation, which leads to high concentrations of NADH and NADPH, that in turn inhibit TCA cycle enzymes, increasing the concentration of acetyl-CoA available for PHB biosynthesis (Manchak & Page, 1994; Senior et al., 1972; Senior & Dawes, 1973).

The regulation of PHB synthesis in *A. vinelandii* is complex and additional regulatory systems are involved. PhbR, a regulator of the AraC family of transcriptional regulators, activates transcription of the *phbBAC* operon, and the stationary growth phase sigma factor RpoS is involved in the control of transcription of *phbR* (Peralta-Gil et al., 2002). The nitrogen-related phosphotransferase system ( $\text{PTS}^{\text{Ntr}}$ ), formed by proteins  $\text{EIN}^{\text{tr}}$ ,  $\text{Npr}$ , and

IIAN<sup>Ntr</sup> regulates PHB synthesis through a phosphorelay from phosphoenolpyruvate, where the IIAN<sup>Ntr</sup> protein acts as negative regulator of PHB synthesis in its non-phosphorylated state (Segura & Espin, 1998; Noguez et al., 2008). It has also been reported that the FNR-like regulatory protein called CydR (Wu et al., 2001) and the iron-regulatory small RNA named ArrF (Pyla et al., 2009) control PHB synthesis in response to the redox state of the cell (oxygen), and the availability of iron respectively.

## 6. Fermentation parameters affecting the production and the composition of alginate

For several decades the synthesis of alginate and PHB by *A. vinelandii* has been the subject of study, either in batch (Clementi et al., 1997; Page & Cornish 1993; Parente et al., 2000; Peña et al., 2000,2011; Sabra et al., 1999; Trujillo-Roldán et al., 2004), continuous (Díaz-Barrera et al., 2009, 2010; Sabra et al., 2000), fed batch cultures (Chen & Page, 1997; Mejía et al., 2010; Priego-Jiménez et al., 2005) and systems with immobilized cells in membrane reactors (Saude & Junter, 2002). In the following sections we will describe and discuss the most recent advances regarding the influence of fermentation parameters, which determine the production and composition of alginate and PHAs.

### 6.1 Influence of the dissolved oxygen tension (DOT) and the oxygen transfer rate (OTR) on the quantity and quality of alginate

Many studies have shown that aeration and mixing are critical parameters for optimizing the production of microbial polysaccharides (Galindo et al., 2007). It is known that under low dissolved oxygen tension (DOT), the organism accumulates the intracellular storage polymer, PHB; whereas at high DOT, *A. vinelandii* uses the carbon source mainly for biomass production. Efficient conversion of sucrose to alginate is achieved only if the oxygen is accurately controlled between 1 and 10% of oxygen saturation (Parente et al., 2000; Peña et al., 2000; Sabra et al., 2000; Trujillo-Roldán et al., 2003). The DOT also affects the composition and molecular mass of the alginate produced by *A. vinelandii*. Studies in bioreactor, under oxygen controlled conditions (Peña et al., 2000; Sabra et al., 2001; Trujillo-Roldán, 2004), indicate that the mean molecular mass (MMM) of the polymer, is strongly influenced by the DOT and the stirring speed of the culture. For example, in cultures conducted at low agitation speed (300 rpm) and DOT of 5 % the MMM of the polymer reached a maximum of 680 kDa. In contrast, at high agitation speed (700 rpm), the MMM increased to a plateau at low DOT (1–3 %) and then decreased at higher DOT (5 %) (Peña et al., 2000). On the other hand, Sabra et al., (2000) reported that in phosphate-limited continuous culture, both the MM and the L-guluronic acid content increased with the DOT, reaching a maximal MM of 800 kDa and a guluronic acid content of 50 % in the cultures conducted at 10 % of air saturation. Those authors proposed that under nitrogen-fixing conditions, the bacterium builds a slimy layer or alginate capsule around the cells, to overcome the oxygen stress and to protect the nitrogenase system, causing a decrease in alginate biosynthesis.

*A. vinelandii* is known for its high respiratory activity (Post et al., 1983) and in cultures without DOT control, the oxygen transfer becomes the limiting factor for growth. Without DOT control, the cultures operate at DOT near zero. Under this condition, a parameter that has been used for studying alginate production is the oxygen transfer rate (OTR). In this line, Díaz-Barrera et al., (2007, 2009) reported that the alginate yield and the MMM of the

polymer were linked to the OTR of the culture. They found that the MMM of the alginate increased as  $OTR_{max}$  decreased, observing that the MMM obtained at  $3.0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  was 7.0 times higher (1560 kDa) than at  $9.0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (220 kDa; Figure 3). It is important to quote that in previous reports the cultures were oxygen limited and under such conditions the carbon source was only partially oxidized, which forced the cells to follow anaerobic pathways with the consequent production of PHB.

More recently, Lozano et al., (2011) reported a study about the evolution of the MMM of the alginate produced by *A. vinelandii* ATCC 9046 in terms of the maximum oxygen transfer rate ( $OTR_{max}$ ) in cultures where the dissolved oxygen tension (DOT) was kept constant. An increase in the agitation rate (from 300 to 700 rpm) caused a significant increase in the  $OTR_{max}$  (from 17 to  $100 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  for DOT of 5 %, and from 6 to  $70 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  for DOT of 0.5 %). This increase in the  $OTR_{max}$  improved alginate production, as well as the specific alginate production rate. In contrast, the mean molecular mass (MMM) of the alginate isolated from cultures developed under non-oxygen limited conditions increased by decreasing the  $OTR_{max}$ , reaching a maximum of 550 kDa at an  $OTR_{max}$  of  $17 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . However, in the cultures developed under oxygen limitation (0.5 % DOT), the MMM of the polymer was practically the same (around 200 kDa) at 300 and 700 rpm and it remained constant throughout the cultivation (Lozano et al., 2011).

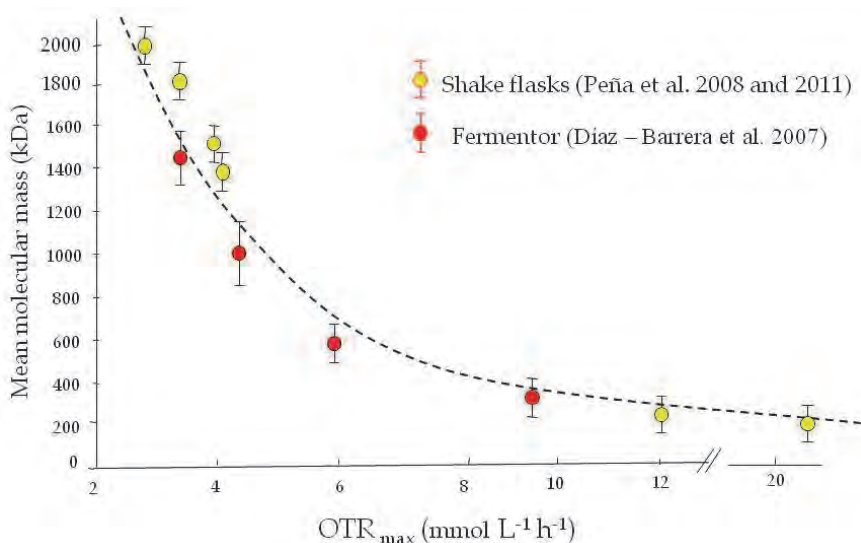


Fig. 3. Mean molecular mass of alginate as a function of the oxygen transfer rate in cultures of *A. vinelandii* in shake flasks and stirred fermentor.

## 6.2 Influence of the medium components

It is widely known that the components of the culture medium play an important role in the production of alginate by *A. vinelandii*. Most studies have focused on assessing the influence of calcium, phosphate and nitrogen on alginate yield and its molecular mass (MM) (Parente et al., 2000; Sabra et al. 1999). Sabra et al., (1999) found that an excess of phosphate in the culture medium ( $400 \text{ mg L}^{-1}$ ) caused a decrease in alginate yield. In the case of nitrogen the



results reported are contradictory, probably because the strain and medium composition used were different (Clementi, 1997; Sabra et al., 2001). Recently, Zapata-Vélez & Trujillo-Roldán (2010) reported that in cultures of *A. vinelandii* in shake flasks, the best nitrogen sources for alginate production were peptone, tryptone, and yeast extract, yielding a maximal alginate concentration of  $4.0 \pm 0.4$  g L<sup>-1</sup>. Those authors found that the highest MMM was obtained in cultures grown with peptone ( $1,520 \pm 110$  kDa), whereas cultures grown with yeast extract, tryptone, ammonium acetate, and ammonium sulphate, showed values between 1,400 and 1,100 kDa. On the other hand, a lower MMM was obtained under N<sub>2</sub>-fixing conditions ( $625 \pm 110$  kDa).

Our group reported the influence of (3N-morpholino)-propane-sulfonic acid (MOPS), a component used in the medium to keep a constant pH, on the quality of the alginate in terms of the chemical composition and rheological behaviour of alginate-reconstituted solutions (Peña et al., 2006). This compound had an important effect on the acetyl content and physicochemical properties of this polymer. A two-fold higher acetylation degree of alginate was obtained when 13.6 mM MOPS was supplemented to the medium. The higher acetylation resulted in greater viscosity of the alginate solutions, but it exhibited less pronounced pseudoplastic behaviour. These changes in the functional properties of the polymer can have great value in terms of specific applications of alginate in food and pharmaceutical fields.

### 6.3 Effect of the specific growth rate

Another important culture parameter for the synthesis of alginate is the specific growth rate (Díaz-Barrera et al., 2009, 2010; Priego-Jiménez et al., 2005). Priego-Jiménez et al., (2005) using exponentially fed-batch cultures, found that the specific growth rate of *A. vinelandii* negatively affects the MM of the alginate and to some extent, the alginate/biomass and alginate/sucrose ratio. This effect was particularly pronounced at very low specific growth rates (0.03 h<sup>-1</sup>), where the  $Y_{P/X}$ ,  $Y_{P/S}$  and the MMM were up to 2.3, 10 and 14 times higher, respectively, than those obtained at a specific growth rate of 0.21 h<sup>-1</sup> (the value found in conventional batch cultures). More recently, Díaz-Barrera et al., (2010) reported, in chemostat cultures, that the alginate MM increased from 800 to 1800 kDa when the dilution rate increased from 0.05 to 0.1 h<sup>-1</sup> at a low inlet sucrose concentration (5 g L<sup>-1</sup>). In contrast, at high sucrose concentration, the MM increased from 1230 to 2500 kDa when the dilution rate, and therefore, the specific growth rate were decreased in the same range. According to the authors, this behaviour is linked to changes in the specific sucrose uptake rate (Díaz-Barrera et al., 2010).

## 7. Parameters that affect PHAs production in *A. vinelandii*

Commercial production of PHAs requires not only high yields and productivities, but also a well defined chemical composition. Fermentation parameters affect the amount of PHAs produced by *Azotobacter*, and their chemical characteristics, such as the kind of polymer produced (PHB homopolymer or PHBV heteropolymer); the MM; and finally, the monomer ratio and distribution along the PHA heteropolymer chain.

PHAs production in different organisms is induced under nutrient limitation (Verlinden et al., 2007). For *Azotobacter* species, oxygen limitation is the most efficient way to induce PHB production (Galindo et al., 2007; Senior & Dawes, 1971, 1973; Verlinden et al., 2007). Besides

oxygen limitation, changes in the carbon and nitrogen sources can affect PHB biosynthesis by *Azotobacter* (Myshkina et al., 2008; Page, 1992). Also, the addition of alkanooates to the medium allows the synthesis of PHAs with different monomer composition (Myshkina et al., 2010; Page et al., 1992).

### 7.1 Oxygen limitation

When *Azotobacter* grows under oxygen limitation there is a reduction in the activity of the tricarboxylic acid cycle (TCA), and the molecules of acetyl-CoA are channeled to PHB production, and the synthesis of PHB acts like an electron sink (Page & Knosp, 1989; Senior et al., 1972). The positive effect of oxygen limitation on PHB production (based on yield and PHB content), has been reported for *A. vinelandii* in batch cultures, using wild type strains UW (Page & Knosp, 1989) and ATCC9046 (Peña et al., 2011), and the PHB overproducer mutant strain UWD (Page & Knosp, 1989). Changes in oxygen concentration have been successfully used in fed batch cultures of *A. vinelandii* UWD (Chen & Page, 1997; Page et al., 2001). Chen & Page (1997), enhanced biomass production of this strain using high aeration during the first stage of the culture and then, at the second stage, aeration was lowered, promoting PHB formation. At the end of the culture, PHB concentration reached 36 g L<sup>-1</sup> of PHB, in contrast to 25 g L<sup>-1</sup> of PHB reported by Page & Cornish (1993) in fed-batch cultures without aeration changes.

On the other hand, there are few reports related to the effect of oxygen on the composition of the PHB produced by *Azotobacter*. Quagliano & Miyazaki (1997) observed in fermentations of *A. chroococcum* 6B that changes in the aeration rate from 0.5 to 2.5 vvm could negatively impact the molecular weight of the PHB with a 10 fold decrease from 1100 to 111 kDa. Myshkina et al., (2008) observed, in cultures of *A. chroococcum* 7B in shake flasks, that the MM increased from 1480 to 1670 kDa when the agitation rate decreased from 250 to 190 rpm. In contrast, the yields of PHB ( $Y_{\text{PHB/Biomass}}$ ) at both agitation rates were the same (0.75 g PHB g<sup>-1</sup>biomass). These authors also evaluated the effect of strict microaerobic and anaerobic conditions during stationary phase, on PHB yield and on its MM. Under these conditions, the PHB content decreased to 2.6 and 1.7 g L<sup>-1</sup>, respectively, but the MM increased, reaching 2215 kDa at the strict anaerobic condition (Myshkina et al., 2008).

### 7.2 Medium composition: carbon and nitrogen sources

The high production cost is the main limiting factor for the use of PHAs for commercial purposes. An alternative to reduce costs is the use of cheaper feedstock (Page, 1992). Several attempts have been made to improve the culture media composition which depends on the microorganism (Table 2). Although *Azotobacter* is a nitrogen fixing bacteria, addition of a fixed nitrogen source can improve PHAs production. Quagliano & Miyasaki (1997), found that increasing the C:N ratio improved PHB yields, although the MM of the polymer dropped eight fold. Page & Cornish (1993) observed that organic nitrogen sources like fish peptone improved PHB production. In addition to the use of low cost nitrogen sources, the use of low price carbon sources is a good alternative to reduce production costs (Page, 1992; Verlinden et al., 2007). Page (1992) found that in shake flasks cultures the addition of 0.5 % (P/V) of beet molasses, increased the PHAs content in *A. vinelandii* UWD to 7 g L<sup>-1</sup>, in contrast to the 1 g L<sup>-1</sup> obtained when using sucrose at 2% (P/V) as a sole carbon source. Although beet molasses were the best carbon source, this strain was also able to grow and produce PHAs using cane molasses, malt extract or corn syrup. However, Myshkina et al., (2008) observed that for *A. chroococcum* 7B, molasses did not improve growth or PHB

production, while the best PHB yields were obtained with commercial sugar and vinasses. These authors also reported that the MM of the PHB could be affected by the carbon source, reaching the highest MM when using glucose, food sugar or starch (1660, 1490 and 1310 kDa).

Strain	Carbon source	Nitrogen source	PHB (gL <sup>-1</sup> )	Y <sub>p/s</sub>	Mw (kDa)	Type of culture	Reference
<i>A. vinelandii</i> UWD	Glucose (1%) and acetate (15mM)	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	2.37	0.25	N.D	Flasks	Page & Knosp, 1989
<i>A. vinelandii</i> UWD	Beet Molasses (5%) and sucrose (2%)	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	7	0.35	N.D	Flasks	Page, 1992
<i>A. vinelandii</i> UWD	Glucose (5%) acetate (15mM)	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> Fish peptone (1%)	25	0.65	1700	Fed batch culture	Page & Cornish, 1993
<i>A. chroococcum</i> 7B	Glucose (4%)	----	4	0.1	1660	Flasks	Myshkina et al., 2008
<i>A. chroococcum</i> 7B	Glucose (2%) Acetate (20mM)	----	4	0.2	1100	Flasks	Myshkina et al., 2008
<i>A. chroococcum</i> 7B	Molasses (4%) Sucrose (2%)	----	1	0.05	N.D.	Flasks	Myshkina et al., 2008

Table 2. PHB production by *Azotobacter* grown with different sources of carbon and nitrogen.

### 7.3 Addition of alkanooates

For several *Azotobacter* spp., the addition of alkanooates to the growth media for PHAs production allows the synthesis of polymers with specific composition (Durner et al., 2000; González-López et al., 1996; Myshkina et al., 2010; Page et al., 1992; Sun et al., 2007; Zinn et al., 2003). The effect of alkanooates addition is dependent on the strain and its metabolism. In cultures of *A. vinelandii* UWD, the addition of odd alkanooates (C<sub>5</sub>-C<sub>9</sub>) allowed the biosynthesis of the copolymer PHBV. Although there was copolymer production using the three different substrates (valerate, heptanoate and nonaoate), the highest proportion of HV was achieved with valerate (Page et al., 1992).

For *A. chroococcum* the biosynthesis of PHBV by addition of not only five carbon valeric acid but of other organic acids (propanoic and hexanoic), was reported. However the best yields and the highest HV content were obtained with valerate (Myshkina et al., 2010). The addition of alkanooates with more than five carbons to *Azotobacter* cultures did not allow biosynthesis of hydroxyalkanoates of a higher monomer chain length (Myshkina et al., 2010; Page et al., 1992). Although *Azotobacter* and *Pseudomonas* are genetically related (Setubal et al., 2009), the PHAs metabolism in *Azotobacter* differs completely from that observed in most *Pseudomonas* species which are efficient producers of mcl-PHAs (Durner et al., 2000; Hartmann et al., 2005; Sun et al., 2007). However, the close genetic relationship between *Pseudomonas* and *A. vinelandii* could be useful for genetic improvement of *A. vinelandii*

strains for the biosynthesis of mcl-PHAs, as has been successfully reported for *E. coli* (Sun et al., 2007; Verlinden et al., 2007).

## 8. Scaling up of alginate and PHAs production

Trying to reproduce in agitated tank the results obtained in plates or in shake flasks, is troublesome and the variables involved are poorly understood. This is particularly important, because the MM of the polymer drops dramatically when the alginate process is scaled up from shake flasks to fermentors (Peña et al., 1997, 2000). Both, the power input ( $P/V$ ) and the oxygen transfer rate (OTR), have been used as scaling up parameters (Peña et al., 2008; Reyes et al., 2003). Recently, our group has studied both the evolution of the specific power consumption and oxygen transfer rate, occurring in shake flasks cultures of *A. vinelandii* (Peña et al., 2007).

These studies have revealed that the power consumption increased exponentially during the course of the fermentation (up to  $1.4 \text{ kW m}^{-3}$ ) due to an increase in the viscosity of the culture broth. Taking these data as a starting point, a scale-up strategy based on the evolution of the power input observed in shake flasks has been evaluated, trying to reproduce in a stirred fermentor culture the MMM of the alginates obtained in shake flasks (Peña et al., 2008). Simulating the evolution of the power input in 14 L fermentors, allowed us to reproduce the MMM and molecular mass distributions of the alginate obtained in shake flasks (Figure 4), a situation that had not been possible to achieve before using other criteria (i.e., initial power input (Reyes et al., 2003)).

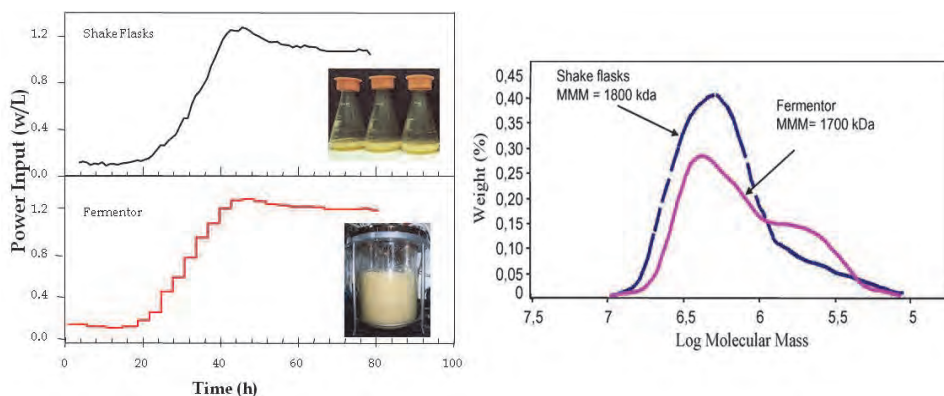


Fig. 4. Scaling-up of alginate production using the evolution of power input as a criterion.

Currently PHAs bacterial production, at industrial scale, is mainly conducted using the strain *C. necator*, until now the most cost-effective fermentative process for the copolymer PHBV (Verlinden, 2007; Wang et al., 2011). In addition, several species of *Pseudomonas* have been described as potential producers of mcl-PHAs (Durner et al., 2000; Hartmann et al., 2005; Sun et al., 2007; Wang et al., 2011). For both fermentation processes the scaling up strategies have focused not only on increasing biomass and polymer content using low cost feedstock, but also on improving chemical properties of the biopolymer. The main strategies proposed in this line are related to the use of fed batch and continuous cultures (Sun et al., 2007; Verlinden et al., 2007;). The PHAs production is usually operated as fed batch cultures,

with an initial growth phase in rich medium in order to obtain a high cell density culture, followed by a product accumulation phase usually under substrate limiting conditions (Verlinden et al. 2007; Sun et al., 2007). It is worthy to point out that for fed batch cultivations it is important to define the composition of the media used for starting the culture, the feeding composition, the type of limitation used for inducing PHA synthesis, and the time at which the feeding should be started. The adequate selection of these parameters can improve the yields and composition of the PHA produced.

Fed batch cultures of *A. vinelandii* UWD using beet molasses have successfully improved PHAs content from 7 g L<sup>-1</sup> obtained in flasks, to up to 25-36 g L<sup>-1</sup> in fed batch cultures, reaching a maximum yield of 0.65 g PHA g<sup>-1</sup>Carbon source (Chen & Page, 1997; Page et al., 2001). Continuous fermentation is an alternative to increase PHAs productivity (Sun et al., 2007). These fermentations have been successfully used to improve mcl-PHAs production parameters with *Pseudomonas* (Sun et al., 2007) and scl-PHAs with *C. necator* (Zinn et al., 2003). Using *C. necator* DSM 428, Zinn et al., (2003) evaluated the PHBV copolymer production under dual (C,N) limitation in chemostat cultures, obtaining controlled composition of the polymer in the range of 0-62 mol % HV. The cultivations in chemostat allowed a constant production of PHB/HV and an accurate control of the polymer composition.

In the case of mcl-PHAs production, Hartmann et al., (2005) evaluated chemostat cultures of *Pseudomonas putida* GPo1 under dual (C, N) limitation. They found, that the monomeric composition of mcl-PHAs was independent of the C:N ratio in the feed media, but it was dependent on the dilution rate. They also found that at low dilution rates, the fraction of aliphatic monomers in the mcl-PHAs was slightly higher than at high dilution rates.

## 9. Design of novel processes to improve alginate and PHA production

Alginate production by fermentation using the *A. vinelandii* bacterium could be a feasible strategy; however, polymer concentrations in batch cultures reported so far are very low, with maximum concentrations of alginate in the range of 3-5 g L<sup>-1</sup> (Parente et al., 2000; Peña et al., 2000; Sabra et al., 2000). It is important to point out that the final alginate concentration is the most important parameter in determining the economics of the process, as it is related to the recovery cost, especially during the precipitation step (Peña et al., 2008). Several fermentation strategies have been reported in the literature with the aim of improving the quantity and/or quality of the alginate (Asami et al., 2004; Cheze-Lange et al., 2002; Mejia et al., 2010; Saude & Junter, 2002). For example, Cheze-Lange et al., (2002) reported the advantages of continuous production of bacterial alginate by *A. vinelandii*, coupled to a system of membranes of varying nominal pore sizes. According to these authors, the yields of alginate with respect to sucrose were significantly higher compared to the batch process. However, the MM of the polymer and the polydispersity were very similar to those of the alginate obtained from batch experiments. Asami et al., (2004) found that the productivity and the fraction of GG-blocks of the alginate produced by *A. vinelandii* in a bubble column were higher than those obtained in shake flasks. They observed that the production of GG-blocks in the late exponential growth phase was higher than that obtained in the stationary phase. However, the authors did not explain the reasons for the difference in the fraction of GG blocks under varying conditions.

Our research group has carried out studies in fed-batch and multistage fermentation processes (Mejía et al., 2010; Priego-Jiménez et al., 2005) that are able to achieve high

biomass concentration, in order to take advantage of the higher specific-alginate production capacities of mutant such as the AT6 strain. Employing a high oxygen concentration (10%) allowed obtaining a maximum biomass concentration of  $7.5 \text{ g L}^{-1}$  in the first stage of the cultivation. In the second stage, the cultures were limited by oxygen (oxygen close to 0%) and fed with a sucrose solution at high concentration. Under those conditions, the growth rate decreased considerably and the cells used the carbon source mainly for alginate biosynthesis, obtaining a maximum concentration of  $9.5 \text{ g L}^{-1}$ , after 50 h of cultivation. Alginate concentration obtained from the AT6 strain was two fold higher than that obtained using the wild-type strain (ATCC 9046) and was the highest reported in the literature (Mejía et al., 2010).

Most of the studies using *Azotobacter* spp. for PHA production have been implemented using batch cultures. Because PHAs are intracellular products and their synthesis occurs under growth limiting conditions, like oxygen limitation, fed-batch fermentation or multistage cultures have been the methods used to achieve high cell densities containing the highest possible amount of PHA with several PHA producers (Akaraonye et al., 2010). On the other hand, continuous cultivation is an interesting alternative strategy because a high productivity can be reached, especially for strains with a high specific growth rate (Akaraonye et al., 2010). However, it is difficult to balance biomass concentration, PHAs content and productivity, because changes in the dilution rate can have opposite effects on cell growth and PHAs synthesis. This is due to the requirement for a nutrient limitation to induce polymer synthesis, at growth rates below the maximum specific growth rate. The ability to produce PHAs under non limiting growth conditions of some *A. vinelandii* strain could represent an advantage to establish continuous culture processes (Page & Knosp, 1989).

Two-stage continuous cultures can help establishing a good growth/PHAs synthesis compromise. Jung et al., (2001) used a two-stage continuous cultivation system with two fermentors connected in series, producing cells at a specific growth rate in the first compartment, and establishing conditions to accumulate PHA at higher rates in a second compartment, with a relatively long residence time. Dilution rates of  $0.21 \text{ h}^{-1}$  in the first fermentor and  $0.16 \text{ h}^{-1}$  in the second fermentor yielded a volumetric PHAs productivity of  $0.06 \text{ g}_{\text{PHA}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , a high productivity for cultures grown on alkanes.

Processes using cheaper substrates have the potential to lower the production costs of PHAs production, but for the use of some of these substrates additional processing is needed. Cerrone et al., (2010) reported an interesting strategy to simultaneously produce PHB and treat olive mil wastewater using *A. vinelandii* UWD, *A. vinelandii* ATCC 12387, or *A. chroococcum*. It consisted on a phase of anaerobic digestion of the olive mil wastewater during 27 h, in order to produce short-chain fatty acids, to later inoculate the *Azotobacter* strains for the aerobic PHA producing stage. Similar strategies could be implemented for the utilization of other agro-industrial residues allowing the use of cheap substrates and additionally reducing costs by linking PHA production with waste disposal processes.

## 10. Down stream processes

Alginate and PHAs have been proposed for novel applications in pharmaceutical and biomedical fields. However, for these applications it is necessary to ensure products with a high purity, and in most cases with a defined chemical composition. Chemical composition of these polymers can be controlled by the fermentation stage, but their purity will be

determined by the down stream processing. Moreover, costs and efficiency of purification procedures could affect the whole process feasibility.

The extraction process of alginate from *Azotobacter*, starts with the supernatant recovery from the fermentation broth by centrifugation. Afterwards, the supernatant is treated with  $\text{NaCl}_2$ , followed by an acidification-hydration step, and finally it is precipitated with isopropanol. This final product could be dried and milled (Sabra & Zeng, 2009). However, alginates for applications in the biomedical and pharmaceutical fields need to be non-immunogenic, and this extraction process does not ensure a high purity of the product. The immunogenic response could be due to the presence of polyphenols, endotoxins or proteins (Ménard et al., 2010). With the purpose of removing these impurities Ménard et al., (2010) proposed the introduction of size exclusion chromatography (SEC). Using this method, the authors observed a reduction of up to 90 % of residual protein contaminants in commercial alginate and therefore a decrease in the immunogenicity of the alginate beads prepared. Once that alginate is purified, it could be modified to enhance or change its physicochemical properties, by either chemical (Yang et al., 2011) or enzymatic methods (Morch et al., 2008). Alginate downstream modifications could include, acetylation, addition of aminoacids and/or proteins, deacetylation, epimerization, oxidation, sulfation and copolymerization.

The PHAs extraction processes require the separation of the cells containing the polymer by centrifugation. The recovery of intracellular PHAs could be carried out by solvent extraction using acetone, chloroform, methylene chloride or dichloroethane. Although this method is the most used, it is also expensive and environmentally unfriendly (Verlinden et al., 2007; Yasotha et al., 2006). Besides, several alternative methods have been developed to improve PHAs purification. Enzymatic digestion does not need hazardous solvents and it shows high selectivity. Yasotha et al., (2006) proposed an enzymatic method coupled to an ultrafiltration system and achieved a final PHAs purity of 92.6 % with a recovery of almost 90 %. However, this method could be very expensive. Another interesting alternative for PHAs recovery was proposed by Page & Cornish (1993), using fish peptone like nitrogen source for the growth of *A. vinelandii*. Fish peptone enhanced PHB production and led to the production of pleomorphic and osmotically sensitive cells. They took advantage of this cell fragility to simplify PHAs extraction method using  $\text{NH}_4\text{OH}$  at 45°C. With this method PHB was recovered with a 94% of purity. Finally, Hejazi et al., (2003), developed a method based on supercritical fluid disruption of the cells using supercritical  $\text{CO}_2$  at 200 atm, with a PHB recovery of 89%. Although this method also uses organic solvents, it requires less than the traditional extraction method.

## 11. Conclusions

Based on a better understanding of the biosynthesis and regulation of alginate and PHAs in *A. vinelandii*, as well as on the development of new cell culture systems for biopolymers production, it is possible to propose new fermentation strategies to obtain alginate and PHAs with specific chemical characteristics and more defined material properties. These materials could be used in specific applications in pharmaceutical and biomedical fields. In summary, this chapter has shown that the use of a multidisciplinary approach, integrating molecular and bioengineering aspects, would allow the optimization of both alginate and PHAs production using *A. vinelandii*.

## 12. Acknowledgment

Financial support of DGAPA-UNAM (grants IN218201, IN216700, and IN221809) and CONACyT (grant 57220, 101643 and 127979) is gratefully acknowledged. The authors acknowledge R. Rodríguez Bahena for his assistance on computer support.

## 13. References

- Akaraonye, E.; Keshavarz, T. & Roy, I. (2010). Production of polyhydroxyalkanoates: the future Green materials of choice. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 85, 732-743.
- Aldor, I. & Keasling, J. (2003). Process design for microbial plastic factories: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoates. *Current Opinion on Biotechnology*, 14, 475-483.
- Asami, K.; Aritomi, T.; Tan, Y. & Ohtaguchi, K. (2004). Biosynthesis of polysaccharide alginate by *Azotobacter vinelandii* in a bubble column. *Journal of Chemical Engineering Japan*, 37, 1050-1055.
- Augst, A.; Joon-Kong, H. & Mooney, D. (2006). Alginate hydrogels as biomaterials. *Macromolecular Bioscience*, 6, 623-633.
- Banki, M.; Gerngross, T. & Wood, D. (2005). Novel and economical purification of recombinant proteins: Intein-mediated protein purification using in vivo polyhydroxybutyrate (PHB) matrix association. *Protein Sciences*, 14(6), 1387-1395.
- Barnard, G.; McCool, J.; Wood, D. & Gerngross, T. (2005). Integrated recombinant protein expression and purification platform based on *Ralstonia eutropha*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 5735-5742.
- Brockelbank, J.; Peters, V. & Rehm, B. (2006). Recombinant *Escherichia coli* strain produces a ZZ domain displaying biopolyester granules suitable for Immunoglobulin G purification. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(11), 7394-7397.
- Campos, M.; Martínez-Salazar, J.; Lloret, L.; Moreno, S.; Núñez, C.; Espín, G. & Soberón-Chávez, G. (1996). Characterization of the gene coding for GDP-mannose dehydrogenase (*algD*) from *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*, 178, 1793-1799.
- Castañeda, M.; Guzmán, J.; Moreno, S. & Espin, G. (2000). The GacS sensor kinase regulates alginate and poly-beta-hydroxybutyrate production in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*, 182, 2624-2628.
- Castañeda, M.; Sanchez, J.; Moreno, S.; Nunez, C. & Espin, G. (2001). The global regulators GacA and sigma(S) form part of a cascade that controls alginate production in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*, 183, 6787-6793.
- Cerrone, F.; Sánchez-Peinado, M.; Juárez-Jiménez, B.; González-López, J. & Pozo, C. (2010). Biological treatment of two-phase olive mil wastewater (TPOMW, alpeorujo): Polyhydroxyalkanoates (PHAs) production by *Azotobacter* strains. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20, 594-601.
- Chen, G. & Page, W. (1997). Production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate by *Azotobacter vinelandii* in a two-stage fermentation process. *Biotechnology Technology*, 11, 347-350.
- Chen, G. & Wu, Q. (2005). The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials*, 26, 6565-6578.



- Chen, G. (2009). A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio-and materials industry. *Chemistry Society Reviews*, 38, 2434–2446.
- Cheze-Lange, H.; Beunard, D.; Dhulster, P.; Guillochon, D.; Caze, A.; Morcellet, M.; Saude, N. & Junter.; G. (2002). Production of microbial alginate in a membrane bioreactor. *Enzyme Microbiology Technology*, 30, 656-661.
- Clementi, F. (1997). Alginate production by *Azotobacter vinelandii*. *Critical Reviews in Biotechnology*, 17, 327-361.
- Conway, T. (1992). The Entner-Doudoroff pathway: History, physiology and molecular biology. *FEMS Microbiology Reviews*, 9, 1-27.
- Díaz-Barrera, A.; Peña, C. & Galindo, E. (2007). The oxygen transfer rate influences the molecular mass of the alginate produced by *Azotobacter vinelandii*. *Applied Microbiology Biotechnology*, 76, 903-910.
- Díaz-Barrera, A.; Silva, P.; Ávalos, R. & Acevedo, F. (2009). Alginate molecular mass produced by *Azotobacter vinelandii* in response to changes of the O<sub>2</sub> transfer rate in chemostat cultures. *Biotechnology Letters*, 31, 825-829.
- Díaz Barrera, A.; Silva, P.; Berrios, J. & Acevedo, F. (2010). Manipulating the molecular weight of the alginate produced by *Azotobacter vinelandii* in continuous cultures. *Bioresource Technology*, 101, 9405-08.
- Donnan, F. & Rose, R. (1950). Osmotic pressure, molecular weight, and viscosity of sodium alginate. *Canadian Journal Research*, 28 (B), 105-113.
- Dörig, G. & Pier G. (2008). Vaccines and immunotherapy against *Pseudomonas aeruginosa*. *Vaccine*, 26, 1011-1024.
- Draget, I. & Taylor, C. (2011). Chemical, physical and biological properties of alginates and their biomedical implications. *Food Hydrocolloids*, 25, 251-256.
- Durner, R.; Witholt, B. & Egli, T. (2000). Accumulation of Poly R- $\beta$ -Hydroxyalkanoates in *Pseudomonas oleovorans* during growth with octanoate in continuous culture at different dilution rates. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(8), 3408-3414.
- Ertesvag, H.; Hoidal, H.; Schjerven, H.; Svanem, B. & Valla, S. (1999). Mannuronan C-5 epimerases and their application for *in vitro* and *in vivo* design of new alginates useful in biotechnology. *Metabolic Engineering*, 1, 262-269.
- Freier, T. (2006). Biopolyesters in Tissue Engineering Applications. *Advances in Polymer Science*. 203, 1-61.
- Fukui, T.; N. Shiomi, & Y. Doi. (1998). Expression and characterization of (R)-specific enoyl coenzyme A hydratase involved in polyhydroxyalkanoate biosynthesis by *Aeromonas caviae*. *Journal of Bacteriology*, 180, 667–673.
- Galindo, E.; Peña, C.; Núñez, C.; Segura, D. & Espin, G. (2007). Molecular and bioengineering strategies to improve alginate and polyhydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii*. *Microbial Cell Factories*, 6, 1-16.
- Gimmestad, M.; Ertesvag, H.; Heggeset, T.; Aarstad, O.; Svanem, B. & Valla, S. (2009). Characterization of three new *Azotobacter vinelandii* alginate lyases, one of which is involved in cyst germination. *Journal of Bacteriology*, 191, 4845-4853.
- González-López, J.; Pozo, C.; Martínez-Toledo, M.; Rodelas, B. & Salmeron, V. (1996). Production of polyhydroxyalkanoates by *Azotobacter chroococcum* H23 in wastewater from olive oil mills (Alpechin). *International Biodeterioration and Biodegradation*, 38 (3-4), 271-276.

- Grage, K.; Jahns, A.; Parlane, N.; Palanisamy, R.; Rasiah, I.; Atwood, J. & Rehm B. (2009). Bacterial polyhydroxyalkanoate granules: biogenesis, structure, and potential use as nano-/micro-Beads in biotechnological and biomedical applications. *Biomacromolecules*, 10, 660-669.
- Grant, G.; Morris, E.; Rees, D.; Smith, P.; & Thom, D. (1973). Biological interactions between polysaccharide and divalent cations: the egg box model. *FEBS Letters*, 32, 195-198.
- Hartmann, R. ; Hany, R. ; Pletscher, E. ; Ritter, A. ; Witholt, B. & Zinn M. (2005). Tailor-made olefinic medium chain length poly R-hydroxyalkanoates by *Pseudomonas putida* Gpo1 : Batch versus chemostat production, *Biotechnology and Bioengineering*, 93 (4), 737-746.
- Hejazi, P. ; Vasheghani-Farahani, E. & Yamini, Y. (2003). Supercritical fluid disruption of *Ralstonia eutrofa* for Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate recovery, *Biotechnology Progress*, 19, 1519-1523.
- Hernández R. ; Orive G. ; Murua A. ; & Pedraz J. (2010). Microcapsules and microcarriers for in situ cell delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62 (7-8), 711-730.
- Hoesli, C. ; Raghuram, K. ; Kiang, R. ; Mocinecová, D. ; Hu, X.L ; Johnson, J. ; Lacík, I. ; Kieffer, T. & Piret, J. (2011). Pancreatic cell immobilization in alginate beads produced by emulsion and internal gelation, *Biotechnology and Bioengineering*, 108 (2), 424-434.
- Hori, Y.; Winans, A.; Huang, C.; Horrigan, E. & Irvine, D. (2008), Injectable dendritic cell-carrying alginate gels for immunization and immunotherapy. *Biomaterials*, 29, 3671-3682.
- Hori, Y.; Stern, P. J.; Hynes, R. & Darrell, J. (2009). Engulfing tumors with synthetic extracellular matrices for cancer immunotherapy. *Biomaterials*, 30 (35), 6757-6767.
- Jahns, A.; Haverkamp, R. & Rehm, B. (2008). Multifunctional Inorganic-Binding Beads Self-Assembled Inside Engineered Bacteria. *Bioconjugate Chemistry*, 19 (10), 2072-2080.
- Jung, K.; Hazenberg, W.; Prieto, M. & Witholt, B. (2001). Two-stage continuous process development for the production of medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates). *Biotechnology and Bioengineering*, 72, 19-24.
- Kashef, N.; Behzadian-Nejad, Q.; Najar-Peerayeh, S.; Mousavi-Hosseini, K.; Moazzeni, M. & Gholamreza E. (2006). Synthesis and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* alginate-tetanus toxoid conjugate. *Journal of Medical Microbiology*, 55, 1441-1446.
- Kennedy, C.; Rudnick, P.; MacDonald, T.; & Melton, T. (2005). Genus *Azotobacter*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, G. M. Garrita, 384-401, vol. 2 part B, Springer-Verlag, New York, NY.
- Khanna, S. & Srivastava, A. (2005). Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry*, 40, 607-619.
- Lee S. (1996). Bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioengineering* 49, 1-14.
- Lee, S.; Park, J.; Park, T.; Lee, S.; Lee, S. & Park, J. K. (2005). Selective Immobilization of Fusion Proteins on Poly(hydroxyalkanoate) Microbeads. *Analytical Chemistry*, 77, 5755-5759.
- Lozano, E.; Galindo, E. & Peña, C. (2011). The quantity and molecular mass of the alginate produced by *Azotobacter vinelandii* under oxygen-limited and non oxygen-limited conditions are determined by the maximal oxygen transfer rate (OTR<sub>max</sub>). *Microbial Cell Factories*, 10, 1-13.

- Ludwig, B.; Zimmerman, B.; Steffen, A.; Yavriants, K.; Azarov, D.; Reichel, A.; Vardi, P.; Grman, T.; Shabtay, N.; Rote, A.; Evron, Y.; Neufeld, T.; Mimon, S.; Ludwig, S.; Brendel, M.; Bornstein, S. & Barkai, U. (2010). A novel device for islet transplantation providing immune protection and oxygen supply. *Hormone Metabolism Research*, 42, 918-922.
- Lynn, A. & Hassid, W. (1966). Pathway of alginic acid synthesis in the marine brown alga, *Fucus gardneri* Silva. *Journal of Biological Chemistry*, 241, 5284-5297.
- Madison, L. & Huisman, G. (1999). Metabolic Engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(1), 21-53.
- Manchak, J. & Page, W. (1994). Control of polyhydroxyalkanoates synthesis in *Azotobacter vinelandii* strain UWD. *Microbiology*, 140, 953-963.
- Mee, C.; Banki, M. & Wood, D. (2008). Towards the elimination of chromatography in protein purification: Expressing proteins engineered to purify themselves. *Chemical Engineering Journal*, 135 (1-2), 56-62.
- Mejía, M.; Segura, D.; Espín, G.; Galindo, E. & Peña, C. (2010). Two stage fermentation process for alginate production by *Azotobacter vinelandii* mutant altered in poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) synthesis. *Journal of Applied Microbiology*, 108, 55-61.
- Ménard, M.; Dusseault, J.; Langlois, G.; Baille, W.; Tam, S.; Yahia, L.; Zhu, X.; & Hallé, J-P. (2010). Role of protein contaminants in the immunogenicity of alginates. *Journal of Biomedical Materials Research part B: Applied Biomaterials*, DOI:10.1002/jbm.b.31570.
- Morch, Y.; Holtan, S.; Donatti, I.; Strand, B. & Skjak-Braek. (2008). Mechanical properties of C-5 epimerized alginates. *Biomacromolecules*, 9, 2360-2368.
- Myshkina, V.; Nikolaeva, D.; Makhina, T.; Bonartsev, A.; & Bonartseva, G. (2008). Effect of growth conditions on the molecular weight of polyhydroxybutyrate produced by *Azotobacter chroococcum* 7B, *Applied Biochemistry and Microbiology*, 44 (5), 482-486.
- Myshkina, V.; Ivanov, E.; Nikolaeva, D.; Makhina T.; Bonartsev A.; Filatova E.; Ruzhitsky A. & Bonartseva G. (2010). Biosynthesis of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate copolymer by *Azotobacter chroococcum* strain 7B. *Applied biochemistry and microbiology*, 46 (3), 289-296.
- Noguez, R.; Segura, D.; Moreno, S.; Hernández, A.; Juárez, K. & Espín, G. (2008). Enzyme I<sup>Ntr</sup>, NPr and IIA<sup>Ntr</sup> are involved in regulation of the poly- $\beta$ -hydroxybutyrate biosynthetic genes in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 15, 244-254.
- Page, W. & Knosp, O. (1989). Hyperproduction of polyhydroxybutyrate during exponential growth of *Azotobacter vinelandii* UWD, *Applied and Environmental Microbiology*, 55(6), 1334-1339.
- Page, W.; Manchak, J. & Rudy, B. (1992). Formation of poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) by *Azotobacter vinelandii* UWD. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 2866-2873.
- Page, W. (1992). Production of polyhydroxyalkanoates by *Azotobacter vinelandii* UWD in beet molasses culture, *FEMS Microbiology Reviews*, 103,149-158.
- Page, W. & Cornish, A. (1993). Growth of *Azotobacter vinelandii* UWD in Fish Peptone Medium and Simplified Extraction of Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 4236-4244.

- Page, W.; Tindale, A.; Chandra, M. & Kwon E. (2001). Alginate formation in *Azotobacter vinelandii* UWD during stationary phase and the turnover polyhydroxybutyrate. *Microbiology*, 147, 483-490.
- Parente, E.; Crudele, M.; Ricciardi, A.; Mancini, M.; Clementi F. (2000). Effect of ammonium sulphate concentration and agitation speed on the kinetics of alginate production by *Azotobacter vinelandii* DSM576 in batch fermentation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 25, 242-248
- Peña, C.; Campos, N.; Galindo, E. (1997) Changes in alginate molecular mass distributions, broth viscosity and morphology of *Azotobacter vinelandii* cultured in shake flasks. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48, 510-515.
- Peña, C.; Trujillo-Roldan, 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 and Microbiology Technology*, 27, 390-398.
- Peña, C.; Hernandez, L. & Galindo, E. (2006) Manipulation of the acetylation degree of *Azotobacter vinelandii* alginate by supplementing the culture medium with 3-(N-morpholino)-propane-sulfonic acid. *Letters of Applied Microbiology*, 43, 200-204.
- Peña, C.; Peter, C.; Büchs, J. & Galindo, E. (2007) Evolution of the specific power consumption and oxygen transfer rate in alginate-producing cultures of *Azotobacter vinelandii* conducted in shake flasks. *Biochemical Engineering Journal*, 36: 73-80.
- Peña, C.; Millán, M. & Galindo, E. (2008). Production of alginate by *Azotobacter vinelandii* in a stirred fermentor simulating the evolution power input observed in shake flasks. *Processes of Biochemistry*, 43, 775-778.
- Peña, C.; Galindo, E.; Büchs, J. (2011). The viscosifying power, degree acetylation and molecular mass of the alginate produced by *Azotobacter vinelandii* in shake flasks are determined by the oxygen transfer rate. *Process Biochemistry*, 46, 290-297.
- Peralta-Gil, M.; Segura, D.; Guzmán, J.; Servin-Gonzalez, L. & Espin, G. (2002). Expression of the *Azotobacter vinelandii* poly-beta-hydroxybutyrate biosynthetic *phbBAC* operon is driven by two overlapping promoters and is dependent on the transcriptional activator PhbR. *Journal of Bacteriology*, 184, 5672-5677.
- Peters, V. & Rehm, B. (2008). Protein engineering of streptavidin for *in vivo* assembly of streptavidin beads. *Journal of Biotechnology*, 134, 266-274.
- Pindar, D. & Bucke, C. (1975). The biosynthesis of alginic acid by *Azotobacter vinelandii*. *Biochemistry Journal*, 152, 617-622.
- Poole, R. & Hill, S. (1997). Respiratory protection of nitrogenase activity in *Azotobacter vinelandii*, roles of the terminal oxidases. *Biosciences Reports*, 17, 303-317.
- Post, E.; Kleiner, D. & Oelze, J. (1983). Whole cell respiration and nitrogenase activities in *Azotobacter vinelandii* growing in oxygen controlled continuous culture. *Archives of Microbiology*, 134, 68-72.
- Priego-Jiménez, R.; Peña, C.; Ramírez, O.T.; Galindo, E. (2005). Specific growth rate determines the molecular weight of the alginate produced by *Azotobacter vinelandii*. *Biochemistry Engineering Journal*, 25, 187-193.
- Pyla, R.; Kim, T.; Silva, J. & Jung, Y. (2009). Overproduction of poly-beta-hydroxybutyrate in the *Azotobacter vinelandii* mutant that does not express small RNA ArrF. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84 (49), 717-724.

- Quagliano, J. & Miyazaki, S. (1997). Effect of aeration and carbon/nitrogen ratio on the molecular mass of the biodegradable polymer poly- $\beta$ -hydroxybutyrate obtained from *Azotobacter chroococcum* 6B, *Applied microbiology and biotechnology*, 48, 662-664.
- Remminghorst, U. & Rehm, B. (2006). Bacterial alginates: from biosynthesis to applications. *Biotechnology Letters*, 28, 1701-1712.
- Reyes, C.; Peña, C. & Galindo, E. (2003). Reproducing shake flasks performance in stirred fermentors: production of alginates by *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Biotechnology*, 105, 189-198.
- Ruth, K.; Grubelnik, A.; Hartman, R.; Egli, T.; Zinn, M.; & Ren Q. (2007). Efficient production of (R)- $\beta$ -hydroxycarboxylic acids by biotechnological conversion of Polyhydroxyalkanoates and their purification. *Biomacromolecules*. 8(1), 279-286.
- Sabra, W.; Zeng, A.; 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 microaerobic conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52, 773-780.
- Sabra, W.; Zeng, A.; Lunsdorf, H. & Deckwer, W-D. (2000). Effect of oxygen on formation and structure of *Azotobacter vinelandii* alginate and its role in protecting nitrogenase *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 4037-4044.
- Sabra, W.; Zeng, A. & Deckwer, W.D. (2001). Bacterial alginate: physiology, product quality and process aspects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56, 315-325.
- Sabra, W. & Zeng, A. (2009). Microbial production of alginates: Physiology and Process Aspects, In: *Alginates: Biology and Applications*, Bernd H. A. Rehm, 153-173, Microbiology Monographs Vol. 13, Springer Verlag, DOI: 10.1007/978-3-540-92679-5, Berlin-Heidelberg.
- Saude, N. & Junter, G. (2002). Production and molecular weight characteristics of alginate from free and immobilized-cell cultures of *Azotobacter vinelandii*. *Process Biochemistry* 2 (37), 895-900.
- Segura, D. & Espin, G. (1998). Mutational inactivation of a gene homologous to *Escherichia coli* ptsP affects poly-beta-hydroxybutyrate accumulation and nitrogen fixation in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*, 180, 4790-4798.
- Segura, D.; Vargas, E. & Espín, G. (2000). Beta-ketothiolase genes in *Azotobacter vinelandii*. *Gene*, 260,113-120.
- Segura, D.; Cruz, T. & Espin, G. (2003a). Encystment and alkylresorcinol production by *Azotobacter vinelandii* strains impaired in polybeta- hydroxybutyrate synthesis. *Archives of Microbiology*, 179, 437-443.
- Segura, D.; Guzmán, J.; & Espín, G. (2003b). *Azotobacter vinelandii* mutants that overproduce poly-beta-hydroxybutyrate or alginate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63, 159-163.
- Senior, P. & Dawes, E. (1971). Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate biosynthesis and the regulation of glucose metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. *Biochemistry Journal*, 125, 55-66.
- Senior, P.; Beech, G.; Ritchie, G. & Dawes, E. (1972). The role of oxygen limitation in the formation of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate during batch and continuous culture of *Azotobacter beijerinckii*. *Biochemistry Journal*, 128, 1193-1201.
- Senior, P. & Dawes, E. (1973). The regulation of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. *Biochemistry Journal*, 134, 225-238.

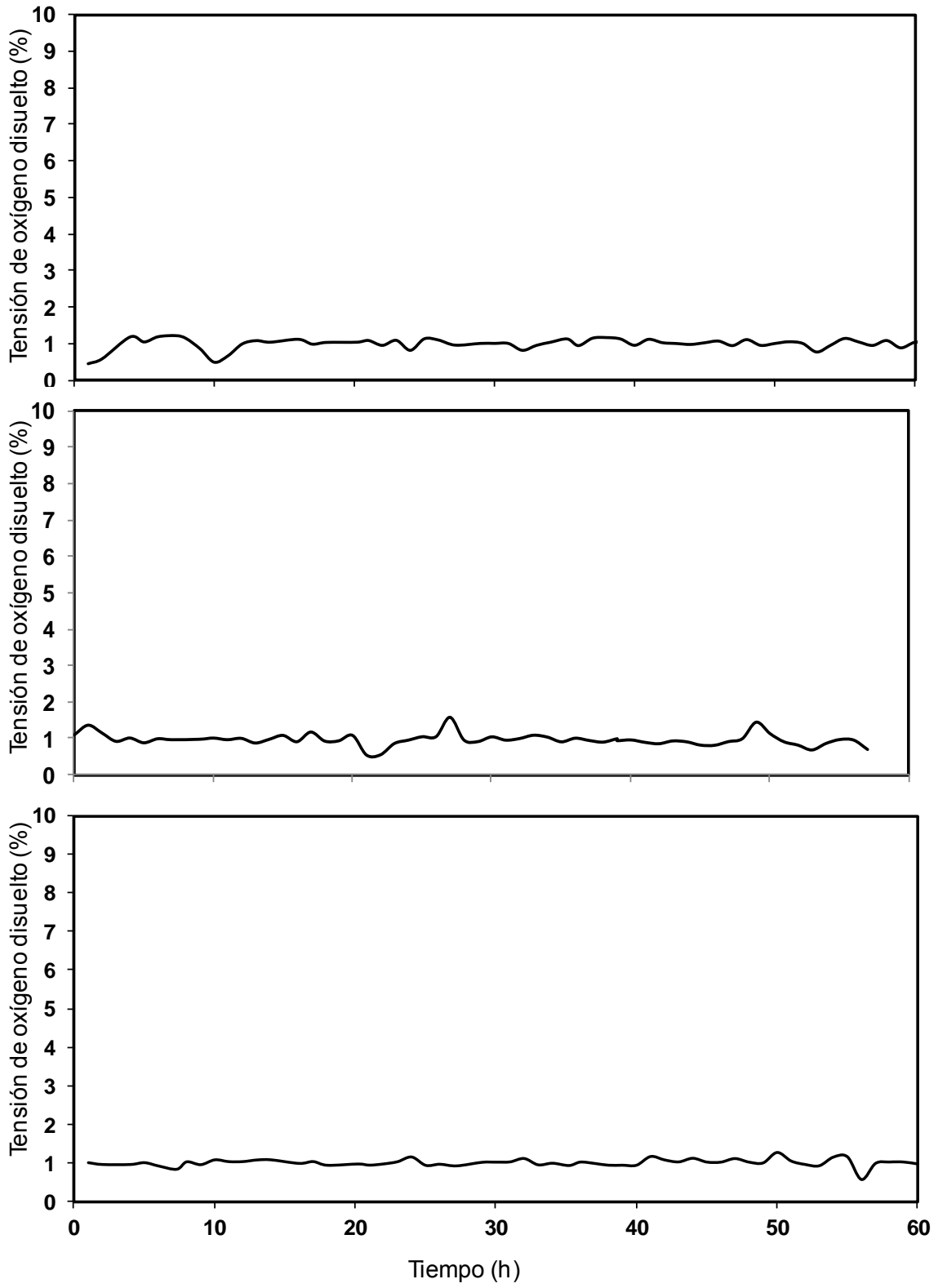
- Setubal, J.; dos Santos, P.; Goldman, B.; Ertesvåg, H.; Espin, G.; Rubio, L.; Valla, S.; Almeida, N.; Balasubramanian, D.; Cromes, L.; Curatti, L.; Du, Z.; Godsy, E.; Goodner, B.; Hellner-Burris, K.; Hernandez, J.; Houmiel, K.; Imperial, J.; Kennedy, C.; Larson, T.; Latreille, P.; Ligon, L.S.; Lu, J.; Mærk, M.; Miller, N.; Norton, S.; O'Carroll, I.; Paulsen, I.; Raulfs, E.; Roemer, R.; Rosser, J.; Segura, D.; Slater, S.; Stricklin, S.; Studholme, D.; Sun, J.; Viana, C.; Wallin, E.; Wang, B.; Wheeler, C.; Zhu, H.; Dean, D.; Dixon, R. & Wood, D. (2009). The genome sequence of *Azotobacter vinelandii*, an obligate aerobe specialized to support diverse anaerobic metabolic processes. *Journal of Bacteriology*, 191(14), 4534-4545.
- Skjak-Braek, G.; Grasdalen, H. & Larsen, B. (1986). Monomer sequence and acetylation pattern in some bacterial alginates. *Carbohydrates Research*, 154, 239-250.
- Smidsrod, O. & Draget, K. (1996). Chemistry and physical properties of alginates. *Carbohydrates European*, 14, 6-12.
- Socolofsky, M. & Wyss, O. (1962). Resistance of the *Azotobacter* cyst. *Journal of Bacteriology*, 84, 119-124.
- Steinbüchel, A. & Lütke-Eversloh, T. (2003). Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. *Biochemical Engineering Journal*, 16, 81-96.
- Sun, H.; Pan,.; Zhigang, Y. & Shi, M. (2007). The immune response and protective efficacy of vaccination with oral microparticle *Aeromonas sobria* vaccine in mice. *International Immunopharmacology*, 7, 1259-1264.
- Sun, Z.; Ramsay J.; Guay M. & Ramsay B. (2007). Fermentation process development for the production of medium chain length poly- $\beta$ -hydroxyalkanoates. *Applied Microbiology Biotechnology*, 75, 475-485.
- Suriyamongkol, P.; Weselake, R.; Narine, S.; Moloney, M. & Shah, S. (2007). Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants – A review. *Biotechnology Advances*. 25, 148-175.
- Taguchi, S. & Doi, Y. (2004) Evolution of polyhydroxyalkanoate (PHA) production system by “Enzyme Evolution”: successful case studies of directed evolution. *Macromolecules Bioscience*, 4, 145-156.
- Trujillo-Roldán, M.; Moreno, S.; Segura, D.; Galindo, E. & Espín, G. (2003). Alginate production by an *Azotobacter vinelandii* mutant unable to produce alginate lyase. *Applied Microbiology Biotechnology*, 60, 733-737.
- Trujillo-Roldán, M.; Moreno, S.; Espín, G. & Galindo, E. (2004). The roles of oxygen and alginate-lyase in determining the molecular weight of alginate produced by *Azotobacter vinelandii*. *Applied Microbiology Biotechnology*, 63, 742-747.
- Valappil, S.; Misra, K.; Boccaccini, A. & Roy, I. (2006). Biomedical applications of polyhydroxyalkanoates, an overview of animal testing and in vivo responses. *Expert Review of Medical Devices*, 3 (6), 853-868.
- Vázquez, A.; Moreno, S.; Guzmán, J.; Alvarado, A.; & Espín, G. (1999). Transcriptional organization of the *Azotobacter vinelandii* *algGXLVIFA* genes: characterization of *algF* mutants. *Gene*, 232, 217-222.
- Verlinden, R.; Hill, D.; Kenward, M.; Williams, C. & Radecka, I. (2007). Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates, *Journal of Applied Microbiology*, 102, 1437-1449.

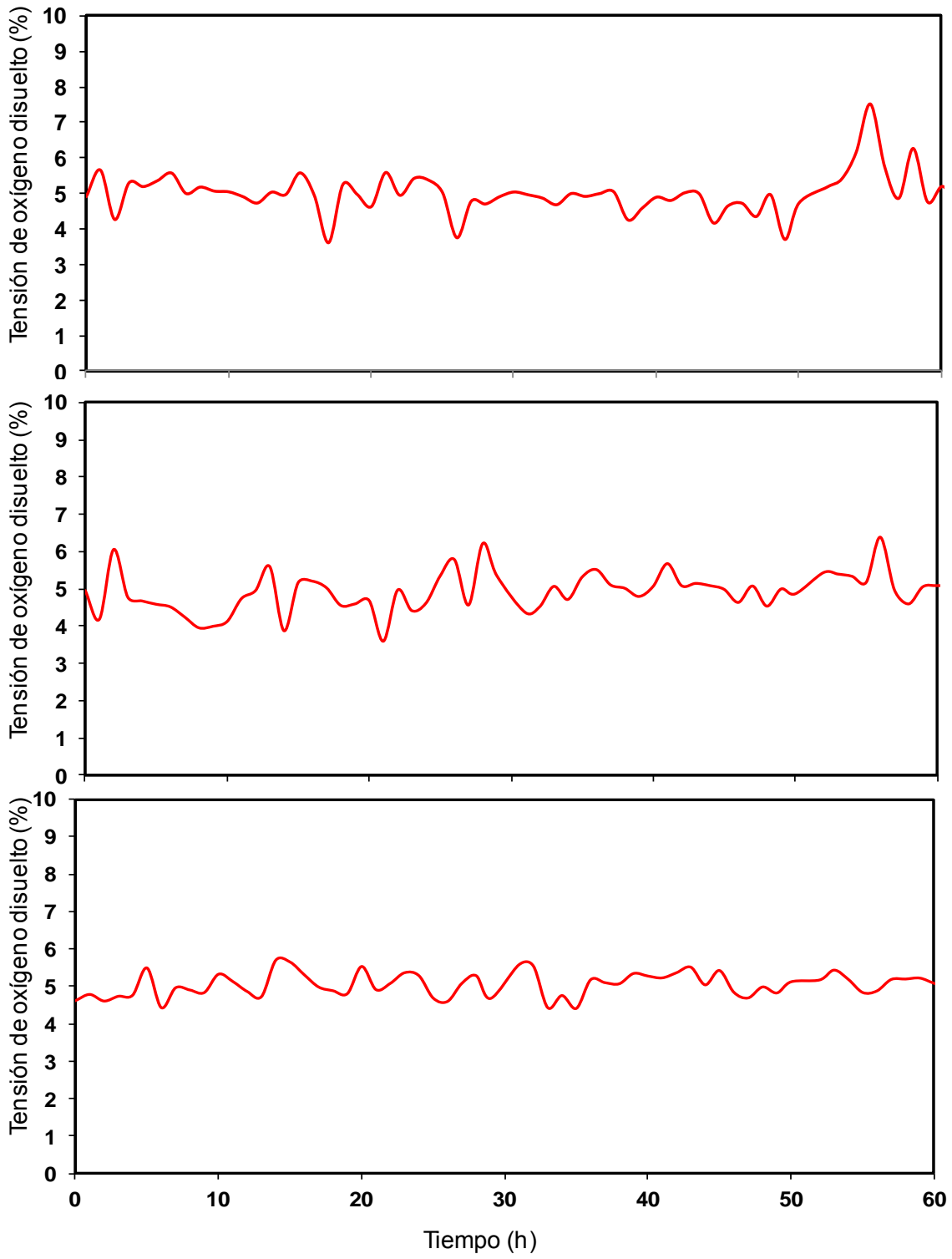
- Wang, Z.; Wu, H.; Chen, J.; Zhang, J.; Yao, Y. & Chen, G.-Q. (2008). A novel self-cleaving phasin tag for purification of recombinant proteins based on hydrophobic polyhydroxyalkanoate nanoparticles. *Lab Chip*, 8, 1957-1962.
- Wang, H.-H.; Zhou, X.; Liu, Q. & Chen G.-Q. (2011), Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate homopolymers by *Pseudomonas putida*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89, 1497-1507.
- Williams, S. & Martin, D. (2005). Applications of Polyhydroxyalkanoates (PHA) in Medicine and Pharmacy. *Biopolymers Online*. DOI: 10.1002/3527600035.bpol4004.
- Wu, G.; Moir, A.; Sawers, G.; Hill, S. & Poole R. (2001). Biosynthesis of polybeta-hydroxybutyrate (PHB) is controlled by CydR (Fnr) in the obligate aerobe *Azotobacter vinelandii*. *FEMS Microbiology Letters*, 194, 215-220.
- Wu, Q.; Wang, Y. & Chen G. (2009). Medical application of microbial biopolyesters Polyhydroxyalkanoates. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 37, 1-12.
- Yang, J.-S.; Xie, Y.-J. & He, W. (2011). Research progress on chemical modification of alginate: A review. *Carbohydrate polymers*, 84, 33-39.
- Yao, Y., Zhan, X.; Zhang, J.; Zou, X.; Wang, Z.; Xiong, Y.; Chen, J. & Chen, G. (2008). A specific drug targeting system based on polyhydroxyalkanoate granule binding protein PhaP fused with targeted cell ligands. *Biomaterials*, 29(36), 4823-4830.
- Yasotha, K.; Aroua, M.; Ramachandran, K. & Tan, I. (2006). Recovery of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates (PHAs) through enzymatic digestion treatments and ultrafiltration, *Biochemical Engineering Journal*, 30, 260-268.
- Zapata-Vélez, A. & Trujillo-Roldán, M. (2010). The lack of a nitrogen source and/or the C/N ratio affects the molecular weight of alginate and its productivity in submerged cultures of *Azotobacter vinelandii*. *Annals of Microbiology*, 60, 661-668.
- Zhang, X.; Luo, R.; Wang, Z.; Deng, Y. & Chen, G. (2009). Application of (R)-3-hydroxyalkanoate methyl esters derived from microbial polyhydroxyalkanoates as novel biofuels. *Biomacromolecules*, 10, 707-711.
- Zinn, M.; Witholt, B. & Egli, T. (2001). Occurrence, synthesis and medical application of bacterial Polyhydroxyalkanoate. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 53, 5-21.
- Zinn, M.; Weilenmann, H.; Hany, R.; Schmid, M. & Egli T. (2003). Tailored synthesis of poly R-β-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate (PHB/HV) in *Ralstonia eutropha* DSM 428, *Acta Biotechnologica*, 23, 309-316.

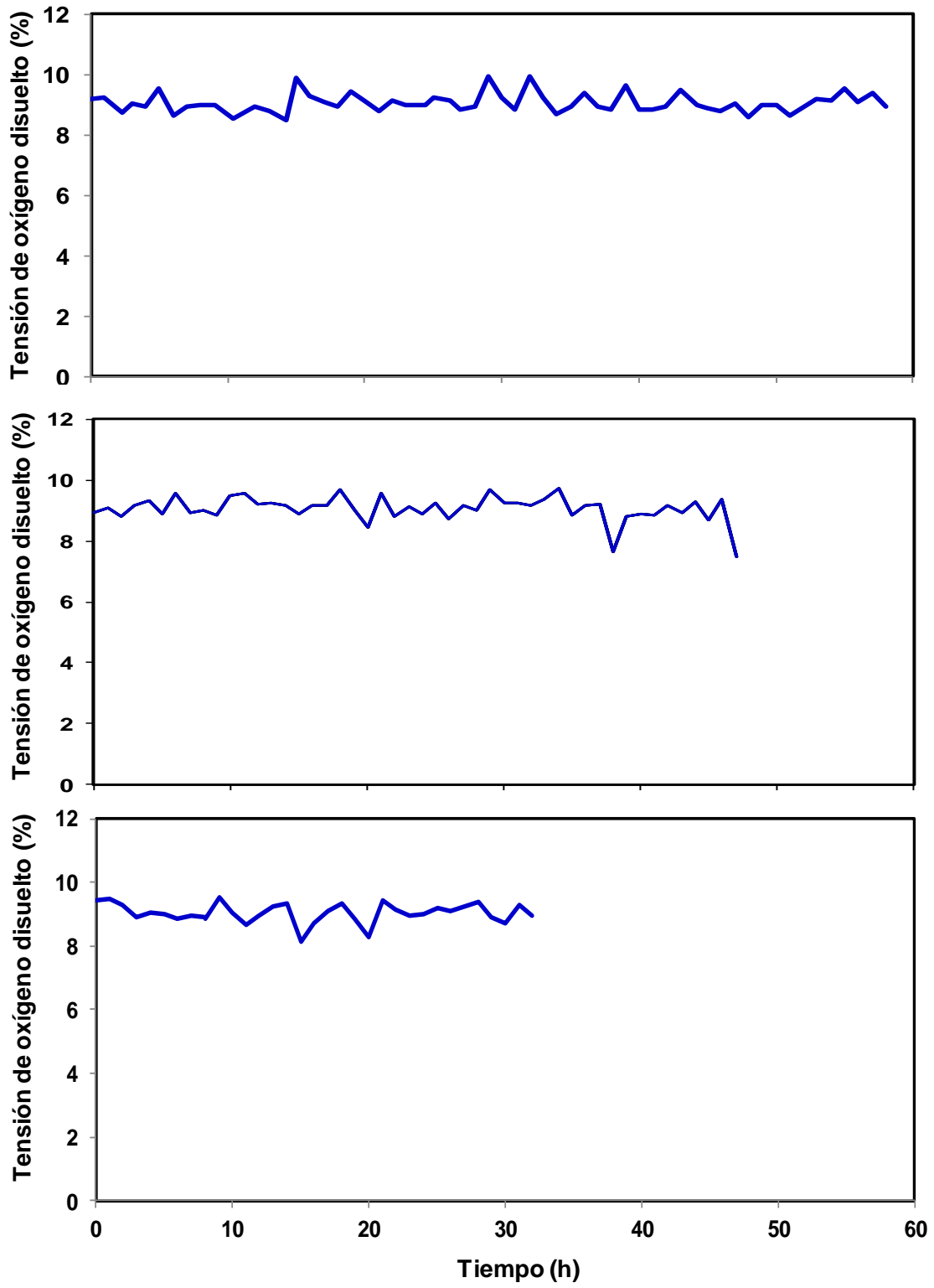
## ANEXO II

### PERFILES DE TENSIÓN DE OXÍGENO DISUELTO



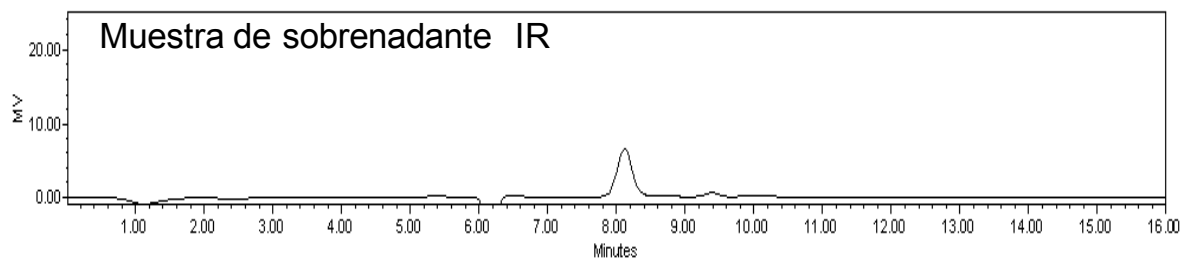
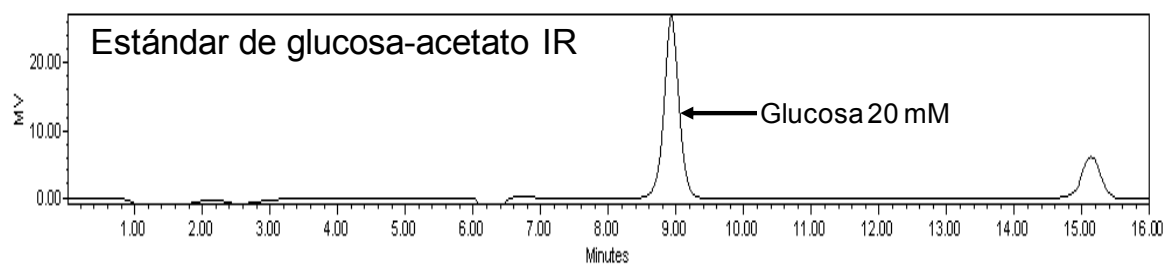
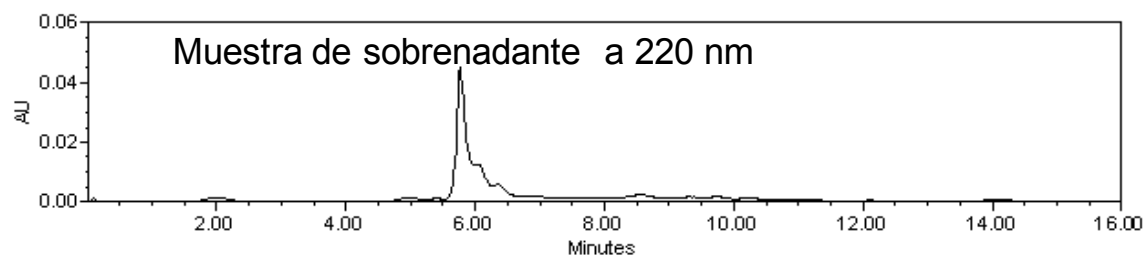
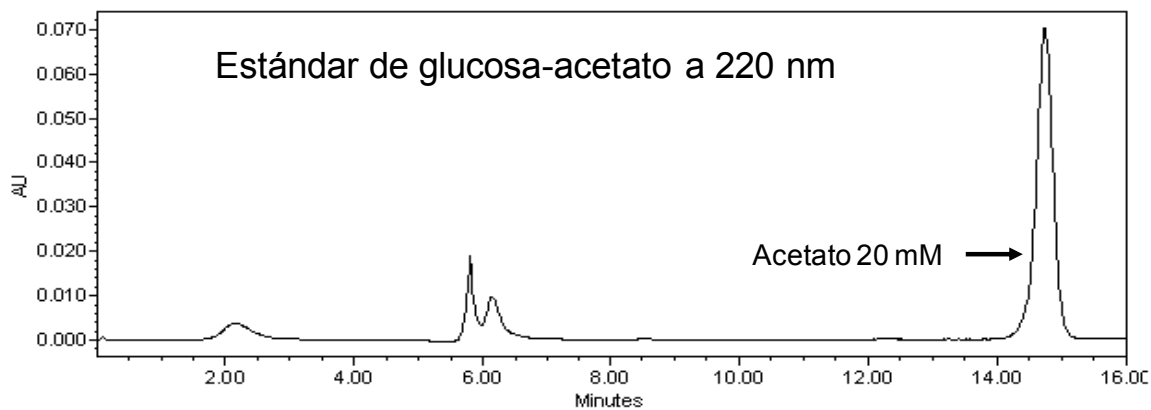






## ANEXO III

CROMATOGRAMAS CARACTERISTICOS DEL  
SOBRENADANTE EN LOS CULTIVOS EN  
CONDICIONES DIAZOTRÓFICAS CON GLUCOSA  
COMO FUENTE DE CARBONO



---

## ANEXO IV

### MATERIAL ADICIONAL DEL ANALISIS DE FLUJO METABOLICO

**Tabla IV.1. Relación masa-carga (m/z) de los iones primarios [M] y los iones de fragmentación generados durante la ionización ([M-57], [M-85] y [M-159]) de los aminoácidos proteínogénicos evaluados en el análisis de flujo metabólico (Delis, 2009)**

<b>Aminoácido</b>	<b>M[m/z]</b>	<b>M-57[m/z]</b>	<b>M-85[m/z]</b>	<b>M-159[m/z]</b>
Alanina	317	260	232	158
Glicina	303	246	218	144
Valina	345	288	260	186
Leucina	359	302	274	200
Isoleucina	359	302	274	200
Serina	447	390	362	288
Fenilalanina	393	336	308	234
Aspartato	475	418	390	316
Glutamato	489	432	404	330
Lisina	488	431	403	329
Arginina	499	442	414	340
Histidina	497	440	412	338
Tirosina	523	466	438	364

En donde, la relación masa/carga de los iones primarios [M] equivale a la masa total del aminoácido derivatizado con el MBDSTFA.

---

---

**Tabla IV.2. Reacciones empleadas para el análisis de flujo metabólico**

v <sub>inp</sub> :	GLC <sub>lab</sub>	→	G6P
v <sub>1</sub> :	F6P	→	GAP + DHA
v <sub>2</sub> :	DHA	→	GAP
v <sub>3</sub> :	GAP	→	3PG + NADH
v <sub>4</sub> :	3PG	→	PEP
v <sub>5</sub> :	PEP	→	PYR
v <sub>6</sub> :	PYR	→	ACA + CO <sub>2</sub> + NADH
v <sub>7</sub> :	PYR + CO <sub>2</sub>	→	OAA
v <sub>8</sub> :	OAA	→	PEP + CO <sub>2</sub>
v <sub>9</sub> :	G6P	→	R5P + CO <sub>2</sub> + 2 NADPH
v <sub>10</sub> [r]:	2 R5P	→	GAP + S7P
v <sub>11</sub> [r]:	GAP + S7P	→	F6P + E4P
v <sub>12</sub> [r]:	R5P + E4P	→	F6P + GAP
v <sub>13</sub> :	OAA + ACA	→	ICT
v <sub>14</sub> :	ICT	→	αKG + CO <sub>2</sub> + NADPH
v <sub>15</sub> :	αKG	→	SUC + CO <sub>2</sub> + NADH
v <sub>16</sub> [r]:	SUC	→	FUM + FADH
v <sub>17</sub> :	FUM	→	OAA + NADH
v <sub>18</sub> :	ICT	→	GOX + SUC
v <sub>19</sub> :	ACA + GOX	→	OAA
v <sub>20</sub> :	G6P	→	KDPG
v <sub>21</sub> :	KDPG	→	PYR + GAP
v <sub>22</sub> :	F-6-P	→	MAN-6-P
v <sub>1<sub>ext</sub></sub> :	MAN-6-P	→	Ácido manurónico + 2 NADH
v <sub>2<sub>in</sub></sub> :	ACA	→	PHB <sub>in</sub>

---