

10
2ej

03088



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MEXICO**

**UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL
Y DE POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES**

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

**Producción de alginatos bacterianos por
fermentación líquida: estudio de los factores
determinantes en la biosíntesis y composición del
alginato producido por *Azotobacter vinelandii***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA

PRESENTA:

M. EN B. CARLOS F. PEÑA MALACARA

259034.

Cuernavaca, Morelos, Febrero de 1998

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

PRESENTACION

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Bioingeniería del Instituto de Biotecnología de la U N A M bajo la dirección del Dr Enrique Galindo Fentanes.

AGRADECIMIENTOS

Con mi más sincero agradecimiento al Dr. Enrique Galindo Fentanes, por haber permitido realizar mis estudios de doctorado bajo su atinada dirección y por el entusiasmo que puso en mi trabajo.

A la participación del comité tutorial integrado por: Dr. Enrique Galindo Fentanes, Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez y Dra. Guadalupe Espín Ocampo por sus valiosas aportaciones en el desarrollo del presente estudio.

A todos los integrantes del jurado por sus valiosos comentarios, sugerencias y aportaciones para la elaboración del presente trabajo.

A todos mis compañeros del laboratorio y de la planta piloto por su apoyo constante.

Este trabajo no hubiera sido posible sin el financiamiento de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM con los proyectos DGAPA IN 503295 y IN506494 y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT.

INDICE

| | |
|---|----|
| I.1.-RESUMEN | 1 |
| I.2.-ABSTRACT | 3 |
| CAPITULO 1 | |
| I.- INTRODUCCION Y JUSTIFICACION | 5 |
| II. -ANTECEDENTES | |
| II. 1.- Características químicas y aplicación de los alginatos bacterianos | 9 |
| II.2.- Biología de <i>Azotobacter vinelandii</i> | 13 |
| II.3.- Biosíntesis de alginato | 15 |
| II.4.- Factores que influyen en la síntesis de alginato | 18 |
| III. OBJETIVOS | 23 |
| CAPITULO 2 | |
| I.- PRESENTACION DEL ARTICULO | 24 |
| “Changes in alginate molecular mass distributions, broth viscosity and morphology of <i>Azotobacter vinelandii</i> cultured in shake flasks”. | 25 |
| CAPITULO 3 | |
| I.-Producción y composición del alginato sintetizado por <i>Azotobacter vinelandii</i> bajo condiciones controladas de oxígeno disuelto y velocidad de agitación. | 31 |
| I.1.-Influencia de la tensión de oxígeno disuelto a velocidad de agitación constante | 31 |

| | |
|---|----|
| I.2 Influencia de la velocidad de agitación a tensión de oxígeno disuelto constante | 36 |
| I.3.-Características químicas de los diversos alginatos sintetizados bajo condiciones controladas de oxígeno disuelto y agitación | 44 |
| I.4.-Conclusiones | 48 |

CAPITULO 4

| | |
|-----------------------|----|
| I.- DISCUSION GENERAL | 50 |
| II.-CONCLUSIONES | 56 |
| III.-RECOMENDACIONES | 58 |

APENDICES

| | |
|--|----|
| I.- APENDICE METODOLOGICO | |
| I.1.- Medio de cultivo y condiciones de crecimiento | 61 |
| I.2.- Determinación del crecimiento microbiano por turbidimetría | 62 |
| I.3.- Determinación del crecimiento microbiano por conteo directo en el contador Coulter | 63 |
| I.4.- Determinación de sacarosa por el método de β -fructofuranosidasa DNS | 63 |
| I.5.- Extracción y cuantificación de alginato | 64 |
| I.6.- Determinación de polihidroxiбутirato (PHB) | 65 |
| I.7.- Determinación de la viscosidad | 66 |
| I.8.- Determinación del grado de acetilación de la molécula de alginato | 66 |
| I.9.- Distribución de pesos moleculares. | 68 |

| | |
|---------------------------|----|
| II.- APENDICE DE CALCULO | 69 |
| III.- APENDICE DE FIGURAS | 73 |
| IV.- BIBLIOGRAFIA | 85 |

1 RESUMEN

Los alginatos son polisacáridos del ácido β -D-manurónico y su epímero el ácido α -L-gulurónico, los cuales son usados como agentes gelificantes, espesantes y estabilizantes en la industrias alimentaria, farmacéutica y textil. Los alginatos comerciales actualmente se obtienen de algas marinas tales como *Laminaria* y *Macrocystis*. Además, dichos polímeros se pueden obtener de diferentes fuentes bacterianas, principalmente de *Azotobacter vinelandii* y varias especies de *Pseudomonas*. El objetivo principal del presente trabajo fue estudiar la influencia de la aireación y la agitación sobre la biosíntesis y composición de alginato en un cultivo en lote de *Azotobacter vinelandii*, así como sobre la morfología de la bacteria.

Se estudió la influencia de condiciones extremas de aireación/agitación imperantes en matraces agitados y en fermentadores, bajo condiciones controladas de oxígeno disuelto y agitación. Los experimentos en matraces, mostraron que condiciones de baja aireación/agitación promueven la síntesis de una mayor cantidad de alginato (4.5 g/L) y con un mayor peso molecular (1.98×10^6 g/mol) con respecto de aquel que se obtiene en cultivos desarrollados bajo alta aireación/agitación. Bajo estas condiciones, las células de *A. vinelandii* tienden a incrementar su diámetro durante el cultivo, mientras que en las células cultivadas en matraces bafleados, el diámetro promedio disminuye.

A nivel de fermentador, la mayor producción de alginato (5.0 g/L) se obtiene a una alta velocidad de agitación (700 rpm) a una tensión de oxígeno constante del 3%. Mientras que, a 300 rpm, la concentración máxima de polímero (en cualquiera de las concentraciones de oxígeno evaluadas), fue entre 1.0 y 4.5 g/L. Observaciones al microscopio de los caldos de fermentación revelaron la presencia de microagregados en los cultivos llevados a cabo a 300 rpm, los cuales presentaron tamaños cercanos a las 40 μ m. Es posible que, a nivel de dichas agrupaciones y/o a una escala mucho mayor (elementos de fluido) se presenten gradientes de oxígeno, los cuales afecten el crecimiento del microorganismo y la síntesis de polímero.

Al igual que la producción de alginato, la composición del mismo se ve afectada por las condiciones operacionales del proceso. La síntesis de un alginato de alto peso molecular (680,000 g/g mol) se observó bajo condiciones en las que se presentan gradientes de oxígeno, con respecto al producto aislado en condiciones homogéneas de oxígeno.

Los resultados demuestran como, a través de un control estricto de las condiciones de cultivo (particularmente la tensión de oxígeno disuelto y la velocidad de agitación), se pueden sintetizar, por vía microbiana, productos con propiedades físicas específicas de utilidad en el mercado de hidrocoloides de la industria alimentaria.

2 ABSTRACT

Alginates are polysaccharides of β -D-mannuronic acid and its C-5 epimer, α -L-guluronic acid, which are used as thickeners, stabilizers, gelling agents and emulsifiers in the food, textile, and pharmaceutical industries. Commercial alginates are currently extracted from marine algae such as *Laminaria* and *Macrocystis*. Alginate can also be obtained from the culture of bacterial sources, namely *Azotobacter vinelandii* and various species of *Pseudomonas*. The main objective of this work was to study the influence of the dissolved oxygen tension and the agitation rate on the biosynthesis and composition of the alginate by *Azotobacter vinelandii* in a batch culture, as well as the morphological variations of the bacteria.

The effect of extreme aeration/agitation conditions on the production and composition of alginate was evaluated in shake flasks. In addition, studies were conducted in a fermentor under controlled conditions of DOT and agitation rate. Experiments in shake flasks revealed that low aeration/agitation conditions promoted the synthesis of alginate (4.5 g/L) and the polymer showed a high molecular weight (1.98×10^6 g/g mol), if compared with the alginates isolated from cultures carried out in baffled flasks (high aeration/agitation conditions). Under low aeration/agitation conditions, the cells of *A. vinelandii* increased in diameter during the cultivation, whereas those cultured in baffled flasks, decreased in size.

In the fermentor (under controlled DOT and agitation rate) the maximal alginate concentration (5.0 g/L) was obtained in the cultures conducted at high agitation rate (700 rpm) maintaining constant the DOT at 3% of air saturation. On the other hand, under low agitation rate (300 rpm), the polymer concentration was between 1.0-4.5 g/L at the different DOT evaluated. Microscopic observations of fermentation broth revealed the presence of cell microaggregates when the culture was conducted at 300 rpm. These particles were one order of magnitude larger than individual cells. It is possible oxygen gradients occur within the microaggregates

and/or the fluid elements, which could affect the microorganism growth and the biosynthesis of the alginate.

In addition to the alginate production, the molecular composition of the alginate was affected by the operational conditions of the process. Under cultures in which oxygen gradients may occur, *A. vinelandii* produced a polymer of high molecular weight (680,000 g/g mol) with respect to the alginate isolated from the cultures conducted under homogeneous oxygen concentration.

Overall, our results showed that the careful control of culture conditions (such as DOT and agitation speed) would allow the production of microbial alginate with particular physical properties, useful in specific applications.

CAPITULO 1

I INTRODUCCION Y JUSTIFICACION

Los alginatos son una familia de polisacáridos constituidos de bloques de ácido manurónico y gulurónico, los cuales se obtienen principalmente de algas marinas del grupo de las feofitas, en las cuales puede comprender más del 40% de la materia seca y de algunas especies bacterianas (Clare, 1993). Los alginatos tienen un amplio uso en la industria alimentaria como agentes gelificantes, espesantes y estabilizantes en la elaboración de postres, aderezos, bebidas, salsas, cremas, etc. Por otra parte, su propiedad para formar geles termoirreversibles se ha utilizado para la inmovilización de componentes celulares o células completas para la preparación de biocatalizadores (Skjak-Braek y Martinsen, 1990).

A nivel mundial, el alginato es el tercer polisacárido con mayor demanda en la industria de hidrocoloides y anualmente su consumo alcanza cerca de 33,000 toneladas, con un precio en el mercado que oscila entre los 5 y los 12 dólares por kg (Mejía, 1997). Del volumen total, cerca del 80% son producidos por una compañía americana (Kelco) y el 20% restante por pequeñas compañías localizadas en Noruega, Alemania, Japón y Australia. En México, la industria de alginatos se inició en 1956 con la explotación de algas café *Macrocystis pyrifera*, las cuales se exportan a los Estados Unidos a la compañía Kelco para su procesamiento (Zertuche-González, 1994). Actualmente, nuestro país, importa anualmente un total de 187,000 kg de alginatos, lo que representa un valor superior al millón de dólares por concepto de importación

La gran variabilidad de la composición de alginato entre cada especie, así como la dependencia de las condiciones climáticas bajo las cuales se produce el polímero, aunado a los altos costos durante su extracción y purificación, han motivado la búsqueda de nuevas fuentes de producción, a partir de las cuales se obtenga un producto con una composición química uniforme. Entre las especies microbianas productoras de alginato más estudiadas

está *Azotobacter vinelandii*, el cual produce un polímero muy parecido al proveniente de las algas, sobre todo con relación a la presencia y longitud de los bloques de ácido gulurónico (Sutherland, 1994). Sin embargo, a diferencia de los alginatos algales, el alginato producido por dicha especie presenta un alto grado de acetilación (generalmente en los residuos manurónicos de la molécula), además de que existen diferencias en la distribución de los ácidos urónicos. Los grupos acetyl sustituyentes, tienen un marcado efecto sobre la capacidad de atrapamiento de iones, además de un ligero efecto sobre la viscosidad de las soluciones de alginato (Davidson *et al.*, 1977; Skjak-Braek *et al.*, 1986).

La producción de alginato por vía microbiana usando cepas de *Azotobacter vinelandii* presenta un gran potencial para ser implementado a nivel comercial. Sin embargo, debido a los bajos rendimientos hasta ahora obtenidos, este proceso no ha logrado constituirse en una alternativa económicamente viable con respecto al material extraído de las algas marinas. Con el propósito de evaluar la síntesis de alginato y de esta manera poder optimizar el proceso fermentativo, se han estudiado diversas variables del proceso, tanto en cultivo en lote como en cultivo continuo, las cuales inciden en la biosíntesis del polímero (Pindar y Bucke, 1975; Jarman *et al.*, 1978; Horan *et al.*, 1983; Brivonese y Sutherland, 1989).

Sin duda, una de las variables de fermentación más importantes, lo es el oxígeno disuelto del caldo de cultivo, el cual afecta, tanto la síntesis de alginato como la acumulación de polihidroxibutirato (PHB), polímero intracelular de reserva. Bajo condiciones de limitación de oxígeno, *A. vinelandii* acumula preferentemente PHB, mientras que a altas tensiones de oxígeno disuelto, el microorganismo utiliza la fuente de carbono principalmente para la producción de biomasa. La conversión eficiente de la fuente de carbono a alginato se obtiene solo si se controla de manera precisa el oxígeno disuelto del medio (Deavin, *et al.*, 1977).

Por otra parte, se ha reportado que las condiciones de aireación del cultivo influyen sobre la composición del alginato producido por *Azotobacter vinelandii* (Annison y Couperwhite, 1986). De acuerdo a estos autores, el grado de acetilación del polímero se incrementa a altos

niveles de aireación, mientras que la composición de residuos urónicos de la molécula es independiente de la velocidad de aireación. En el caso del alginato producido por cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, Leitao y Sa-Correia (1993) han encontrado que altos niveles de oxígeno disuelto del caldo de fermentación favorecen la producción de un polímero con un alto peso molecular. Para otros polímeros, como el caso de xantana producida por *Xanthomonas campestris*, se ha encontrado que la proporción de componentes de alto peso molecular se incrementa al aumentar los niveles de oxígeno disuelto en el rango de 10 a 40% de saturación (Flores *et al.*, 1994)

No obstante que los estudios previos han revelado la importancia del oxígeno durante la producción de alginato, actualmente no existe en la literatura un estudio sistemático en relación al efecto de las condiciones de aireación sobre la distribución de pesos moleculares del alginato asociados a sus características reológicas. Por tal razón, la primera parte del presente estudio se abocó a la evaluación de diferentes condiciones de aireación sobre la producción del alginato y su distribución de pesos moleculares. También se estudiaron las características viscosificantes de las resuspensiones del polímero. El primer acercamiento al fenómeno se llevó a cabo en condiciones extremas de aireación, utilizando para esto matraces agitados con configuraciones que permitieron establecer situaciones de alta y baja ventilación del medio. Cabe señalar la importancia de los estudios en matraces agitados, ya que dichos sistemas son ampliamente utilizados para la selección de cepas microbianas, así como en la realización de estudios sobre la morfología y fisiología microbiana (van Suijdam, *et al.*, 1978)

Posteriormente, se realizaron estudios a nivel de fermentador en condiciones controladas de oxígeno disuelto, los cuales nos permitieron analizar el efecto independiente de la tensión de oxígeno disuelto, manteniendo constantes las condiciones hidrodinámicas del sistema, sobre la producción y composición del alginato en términos de su peso molecular y el grado de acetilación.

Al igual que el oxígeno, la agitación del caldo de cultivo es de particular importancia durante la producción de alginato. En un cultivo mal agitado, se presentan gradientes de concentración de sustratos y productos en el seno de la suspensión, lo cual va a repercutir en las eficiencias de producción (Lawford y Rousseau, 1991). Por otra parte, altas velocidades de agitación en el fermentador -tendientes a mejorar el mezclado y la transferencia de oxígeno en el medio - pueden promover la liberación de enzimas líticas periplásmicas, las cuales modifican la estructura del polímero ya sintetizado (Horan *et al.*, 1983).

No obstante la importancia que esta variable puede tener en la biosíntesis y composición del polímero, es escasa la información en la literatura concerniente a la influencia de las condiciones hidrodinámicas. En la producción de otros biopolisacáridos, tales como: la xantana producida por *Xanthomonas campestris* (Peters *et al.*, 1989); el β -1.3-glucano (curdlano) sintetizado por *Agrobacterium radiobacter*, (Lawford y Rousseau, 1991) y el pululano producido por *Aureobasidium pullulans* (Wecker y Onken, 1991), se ha demostrado que las condiciones hidrodinámicas imperantes en el bioreactor determinan tanto la producción como la calidad del producto.

Debido a lo anterior, en la tercera parte del trabajo, se estudió de manera sistemática la influencia de la velocidad de agitación (bajo condiciones de oxígeno constante), sobre la producción de alginatos y sus distribución de pesos moleculares. Los resultados de dichos experimentos nos permitieron esclarecer de que forma las condiciones hidrodinámicas imperantes en el bioreactor determinan las síntesis y composición del alginato, a través del análisis mecanístico del fenómeno.

II ANTECEDENTES

II.1 Características químicas y aplicación de los alginatos bacterianos

La estructura química, así como las propiedades funcionales de los alginatos bacterianos es muy parecida a aquella de los alginatos de algas. Como se muestra en la figura 2.1, estos polisacáridos son copolímeros lineales del β -D-ácido manurónico y su epímero (el α -L-ácido gulurónico) unidos invariablemente mediante enlaces glicosídicos (1-4). Los residuos de ácidos urónicos pueden formar regiones homopoliméricas de una unidad u otra, llamados bloques M o G y regiones heteropoliméricas en donde los residuos se encuentran alternados, llamados bloques MG (Larsen y Haug, 1971; Jarman *et al.*, 1978).

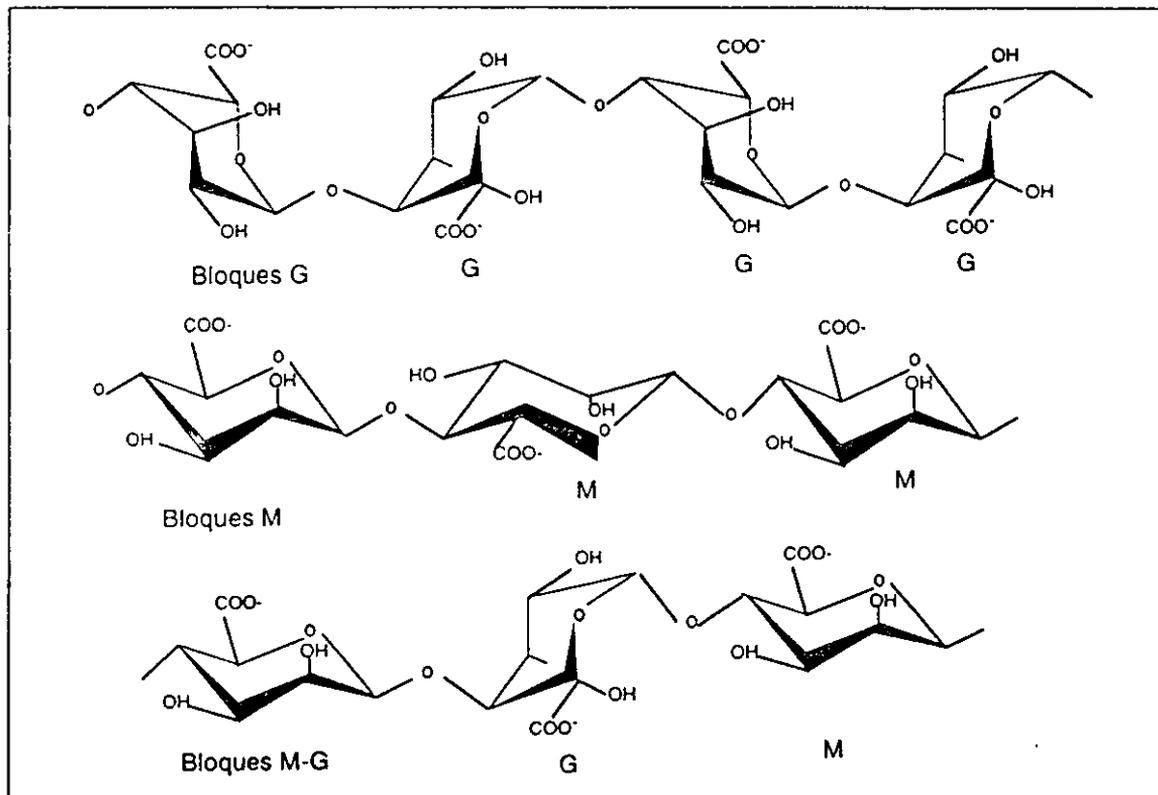


Figura 2.1. Estructura química y organización del alginato.

Como se observa en la tabla 2.1, la composición química de los alginatos varía dependiendo de la fuente de producción. El polímero producido por *Azotobacter vinelandii* presenta un alto grado de acetilación, con los grupos acetilo asociados invariablemente en C₂ y C₃ de los residuos D-manurosilos (Skjak-Brack *et al.*, 1989). Por otra parte, los polímeros de otras especies bacterianas, tal como el de *Pseudomonas*, contienen una alta proporción de ácidos manurónicos en su estructura y no presentan bloques prolongados de ácido gulurónico (Singh *et al.*, 1987).

Tabla 2.1. Composición química del alginato de diversas fuentes

| Fuente de producción | Relación Manurónico/Gulurónico | Grado de acetilación (%) | Bloques de guluronato | Referencia |
|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------|-----------------------|-------------------|
| <i>Laminaria hiperborea</i> | 0.38-0.45 | 0 | 0.58 | Gacesa (1988) |
| <i>Macrocystis pyrifera</i> | 1.40-1.85 | 0 | 0.22 | Grasdalen (1983) |
| <i>Azotobacter vinelandii</i> | 0.6-1,22 | 21-50 | 0.41 | Gacesa (1988) |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 1.20-2.80 | 37-57 | 0 | Sutherland (1990) |

La presencia de grupos acetilo en el alginato bacterial afecta la selectividad de enlace del alginato con iones divalentes como el Ca²⁺ y el Sr²⁺ (Geddie y Sutherland, 1994). La capacidad de enlace de cationes de calcio, así como su selectividad por este ión, se reducen significativamente en la molécula acetilada. Por otra parte, los alginatos con un alto contenido de residuos guluronosilos presentan una alta afinidad por el calcio (Morris, 1990; Annison y Couperwhite, 1984). En estos polímeros se presenta un mecanismo de cooperatividad para quelar iones calcio entre los residuos contiguos o bloques de ácido gulurónico provocando

una marcada histéresis. Este fenómeno es debido a la formación de anillos que contienen iones, enlazando diferentes cadenas poliméricas muy estables a la disociación, dando lugar a la conformación del gel (Morris, 1987).

Los alginatos extraídos de algas marinas, presentan una relación M/G entre 0.45 y 1.85, mientras que en el polímero bacterial, la relación puede llegar a ser cercana a 3 (tabla 1). Los polímeros con un alto porcentaje de ácidos gulurónicos (relación M/G baja), tienen una mayor capacidad de enlace intercatenario que los productos ricos en manurónico. Los primeros, producen geles fuertes pero quebradizos (Haug y Larsen, 1971). En contraparte, los productos con una alta relación M/G, como el caso de la mayoría de los alginatos bacteriales, forman geles elásticos de baja fuerza, los cuales incrementan su fuerza al incrementar la longitud de bloques poligulurónicos. En los alginatos en donde predomina la alternancia de residuos manurónico y gulurónico, se disminuye el número de entrecruzamientos de la molécula y, como consecuencia, la fuerza del gel; además, cuando se incrementa la longitud de la cadena, el polímero puede llegar a ser menos elástico (Gacesa, 1988).

Los alginatos bacterianos generalmente producen soluciones altamente viscosas. Desde el punto de vista reológico, las soluciones de alginato se comportan como fluidos no Newtonianos de tipo pseudoplástico; esto es, aquellos en donde la viscosidad aparente disminuye al incrementar la velocidad de deformación. La viscosidad del alginato es producto de la relación que guarda el volumen hidrodinámico del polímero con el peso molecular del mismo y se verá influenciada por la concentración de alginato, la fuerza iónica y en menor grado por la relación de ácidos urónicos y la distribución de éstos en la cadena (Mitchel, 1991). No obstante, existen reportes que indican que los alginatos ricos en bloques de ácidos manurónicos y bloques alternos de residuos manurosil y gulurosil tienden a formar soluciones viscosas, mientras que los alginatos ricos en bloques de ácido gulurónico promueven la formación de geles (Annison y Couperwhite, 1986). Por otra parte, al igual que otros polímeros, la viscosidad de las soluciones de alginato disminuye cuando se incrementa la temperatura y en temperaturas excesivas se presenta una despolimerización de la molécula.

En cuanto al pH, la viscosidad del alginato se incrementa notablemente en rangos de pH de 3.0 a 4.5, mientras que a pHs muy altos tiende a formar geles (Sandford y Baird, 1983).

Los alginatos se han utilizado para una amplia gama de aplicaciones (tabla 2.2) donde muchas de sus características funcionales se han explotado. Estos polisacáridos pueden ser utilizados como agentes espesantes, como estabilizantes de espumas y emulsiones, así como para la resuspensión de sólidos (Sengha *et al.*, 1989). Recientemente, este polímero se han utilizado como soporte para la inmovilización de células vivas debido a su capacidad para la formación de geles con cationes (Skjak-Braek y Martinsen, 1990). Para este tipo de aplicaciones, las características de difusión, porosidad y homogeneidad, también como la estabilidad química y mecánica, son propiedades importantes de la matriz del gel. Dichas propiedades dependen fuertemente de la composición química y del peso molecular de los alginatos (Martinsen *et al.*, 1991). Por otra parte, cuando el alginato es usado para la elaboración de microcápsulas, la distribución de pesos moleculares es de suma importancia para el control de la porosidad y de la distribución del tamaño del poro de la membrana capsular.

Tabla 2.2 Principales aplicaciones de los alginatos*

| Area de aplicación | Función | Ejemplos específicos |
|----------------------------------|--------------------|--|
| | Estabilizante | Estabilización de espumas |
| Industria de bebidas y alimentos | Viscosificante | Suspensión de frutas Espesante de salsas y aderezos |
| | Agente gelificante | Reconstitución de alimentos |
| Industria farmacéutica | Estabilizante | Emulsiones para cosméticos |
| | Agente gelificante | Impresiones dentales |
| | Fibras y películas | Bandas hemostáticas Cubiertas para tabletas |
| Otros usos | Viscosificante | Tintas para impresión Inmovilización de células y enzimas |

*(Gacesa, 1988)

II.2 Biología de *Azotobacter vinelandii*

Azotobacter vinelandii es una bacteria de tipo Gram-negativo, la cual se desarrolla en ambientes aeróbicos y es capaz de fijar el nitrógeno atmosférico mediante tres diferentes sistemas de nitrogenasas. Esta característica hace única a esta bacteria entre las especies que realizan esta función, por lo cual se ha estudiado con especial interés a nivel molecular (Kennedy y Toukdarian, 1987). Generalmente, las células de *A. vinelandii* presentan formas bacilares y un tamaño de aproximadamente $2 \times 5 \mu\text{m}$, con un volumen diez veces superior al de otros bacilos, tal como *Escherichia coli* (Sadoff, 1975). Bajo el microscopio electrónico, las células vegetativas son alargadas y con un conspicuo nucleosoma; además, se observa una membrana interna definida, entre el periplasma y la membrana externa, en la cual se forman invaginaciones o vejigas que funcionan como núcleos de nitrogenasas (Page y Saddof, 1976).

Dependiendo de la fuente de carbono y su concentración, así como de las condiciones físicas de cultivo, *A. vinelandii* sintetiza dos polímeros de importancia, el polihidroxiбутirato (PHB), un poliéster intracelular de reserva y el alginato, el cual es utilizado por la bacteria durante el proceso de enquistamiento. Se ha postulado que el alginato le sirve a la bacteria como una barrera protectora contra la toxicidad de metales pesados (Jarman, *et al.*, 1978), así como una barrera para la difusión de oxígeno y como un sistema de intercambio iónico con una selectividad específica para los cationes divalentes como el calcio (Post *et al.*, 1982; Larsen y Haugh, 1971) o para proporcionar a la célula una cubierta hidrofílica, cargada negativamente, la cual le ofrece protección contra el ataque de bacteriófagos.

El ciclo de vida de *A. vinelandii* incluye una fase vegetativa y un estado de vida latente en forma de microquiste (figura 2.2). Las células vegetativas de esta especie presentan movimientos a través de flagelos peritricos y las células en proceso de división adoptan una forma de tipo "cacahuete". En ausencia total de fuente de carbono y bajo inducción con β -hidroxibutirato se generan los quistes de *Azotobacter*, los cuales son de forma esférica y refráctiles cuando se observan al microscopio. Inicialmente, el cuerpo basal presenta una

forma elíptica con una acumulación de gránulos de PHB, desarrollándose en su superficie un gran número de protuberancias de forma globular de diferentes tamaños. Conforme transcurre el tiempo, dichas estructuras se transforman en una cubierta interna (intina), constituida en su mayoría de ácido polimanurónico. Posteriormente, los gránulos de PHB disminuyen en número y se observa la formación de una segunda cubierta extracelular, constituida preferentemente de ácido galurónico, llamada exina (Page y Sadoff, 1976; Lin *et al.*, 1978).

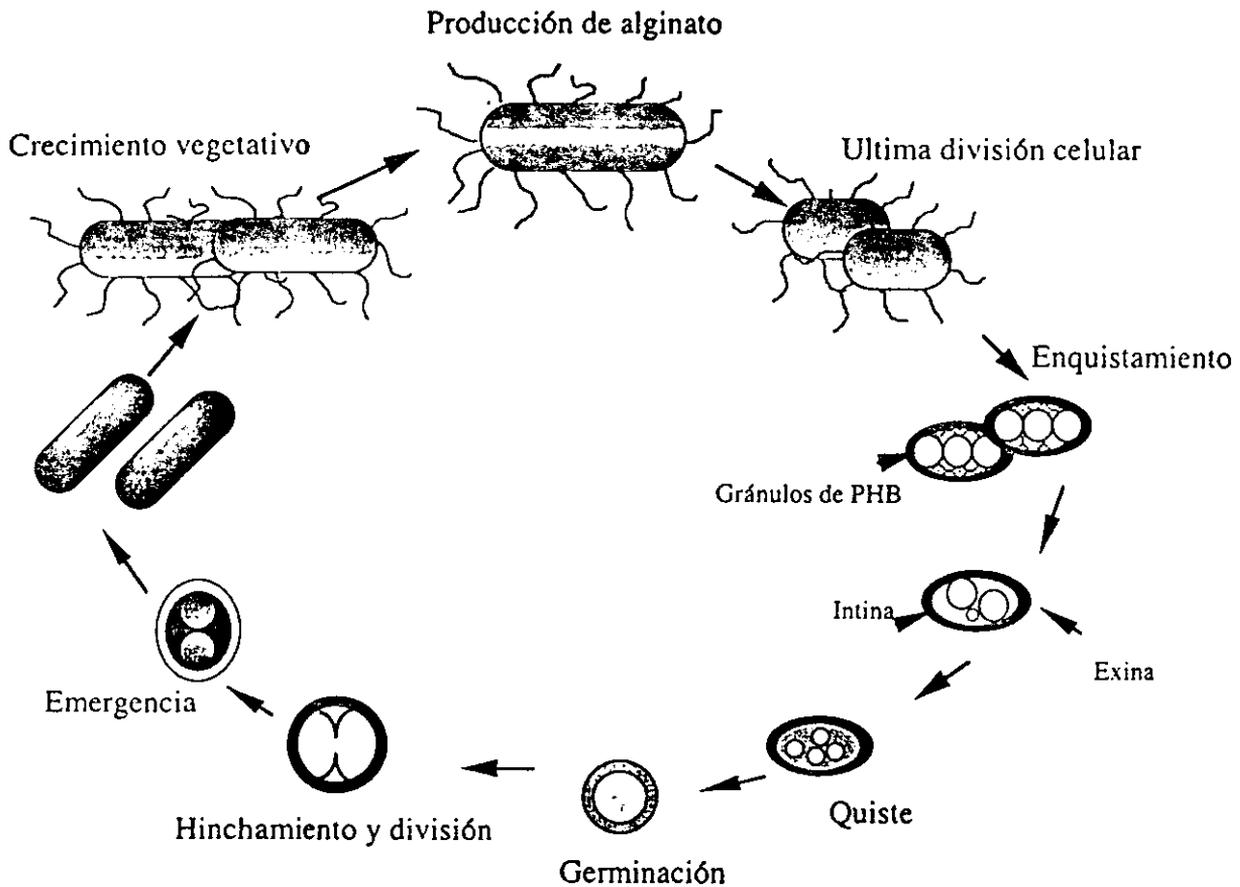


Figura 2.2 Ciclo de vida de *Azotobacter vinelandii*.

En presencia de una fuente de carbono adecuada y bajo condiciones de fijación de nitrógeno, el quiste sigue un proceso de germinación, en donde el cuerpo central incrementa su tamaño, sufriendo una elongación. Conforme la germinación prosigue, se observan estructuras de tipo fibrilar y vesicular en la región de la intina, asociadas a una disminución marcada del

contenido de PHB. Posteriormente, hay una desintegración de la exina y se presenta una regeneración de los flagelos celulares. Después de unas horas, se observa el proceso de división celular, resultando dos células de forma oval, las cuales reiniciarán el desarrollo de una célula vegetativa (Lin *et al*, 1978).

II.3.-Biosíntesis de alginato

La biosíntesis de alginato en *Azotobacter vinelandii* ha sido investigada por diversos autores (Pindar y Bucke, 1975; Jarman, 1979; Fyfe y Govan, 1983; Anderson *et al.*, 1987). Los primeros estudios realizados por Pindar y Bucke (1975), sugirieron que la biosíntesis de alginato bacterial seguía una vía metabólica similar a la observada en algas feofitas. Estudios más recientes, revelan que el alginato es sintetizado principalmente de los productos de degradación de la glucosa a través del gliceraldehído 3-fosfato, producido por la vía de Entner-Doudoroff, mientras que la mayoría del polímero sintetizado a partir de fructosa es ensamblado como unidades intactas de glucosa (Anderson *et al.*, 1987) (figura 2.3).

Partiendo de la sacarosa como fuente de carbono, una invertasa (EC 3.2.1.26) genera D-glucosa y D-fructosa. A partir de estas, se forma la fructosa-6-fosfato, la cual inicialmente es isomerizada a manosa-6-fosfato, mediante la fosfomanosa isomerasa (PMI; EC 5.3.1.8) y transformada a manosa-1-fosfato, mediante la fosfomanosa mutasa (PMM; EC 5.4.2.8). En la siguiente etapa, la manosa 1-fosfato es activada a GDP-manosa con la enzima GDP-manosa-pirofosforilasa (GMP; EC 2.7.7.13). La enzima GDP-manosa-deshidrogenasa (GMD; EC 1.1.1.132) dependiente de NAD⁺, se encarga de llevar a cabo una doble oxidación, formando 2NADH+H⁺, mientras que el sustrato GDP-manurónico es polimerizado a nivel de la membrana plasmática, formando la cadena de ácido polimanurónico (poli-M) (Pace y Righelato, 1980). Los residuos de ácido manurónico son ensamblados y acetilados sobre un acarreador isoprenoide (bactoprenol) y finalmente es polimerizado y excretado de la célula bacteriana como polimanurato acetilado.

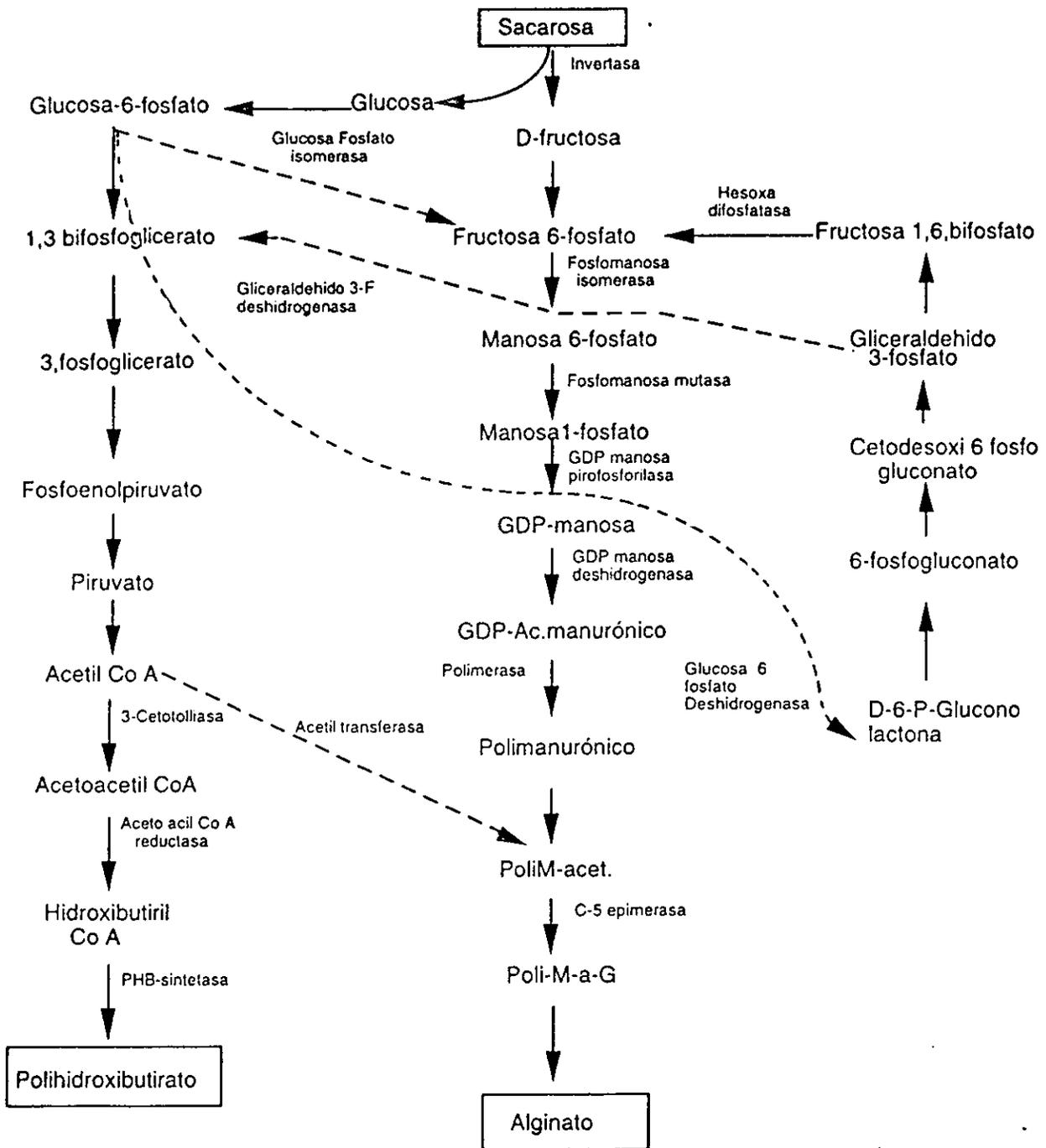


Figura 2.3. Biosíntesis de alginato y PHB por *Azotobacter vinelandii*.

Posteriormente, algunos residuos de ácido manurónico no acetilado son modificados por una epimerasa C-5 extracelular a ácido gulurónico (Sutherland, 1990). Se han identificado 3

enzimas clave como las más importantes en la síntesis del alginato; estas son: fosfomanosa-isomerasa, GDP-manosa-pirofosforilasa y GDP-deshidrogenasa. Estudios realizados por Horan *et al.* (1981, 1983), revelan que la velocidad de biosíntesis de alginato en un cultivo en lote de *Azotobacter vinelandii* está controlada por la inducción y represión de las enzimas mencionadas, por un mecanismo hasta la fecha no dilucidado.

Otra enzima de especial importancia en la síntesis de alginato es la C-5 epimerasa, la cual requiere de iones calcio para su actividad. (Larsen y Haug, 1971; Annison y Couperwhite, 1984). El papel de los iones calcio durante la epimerización del alginato es doble; en concentraciones de calcio entre 0.068 a 0.34 mM y bajas concentraciones de alginato, el patrón de reacción de la epimerasa de *A. vinelandii* favorece la incorporación de residuos L-gulurósilos vecinales, promoviendo así la formación de bloques largos de ácido gulurónico. Por otra parte, si la concentración de calcio es mayor a 0.68 mM el ácido gulurónico que se produce forma asociaciones ordenadas a través del calcio, las cuales impiden una mayor epimerización de los residuos manurósilos. Lo anterior trae como consecuencia la formación de un alto contenido de secuencias alternadas (Annison y Couperwhite, 1986). La actividad de la epimerasa también se afecta por la presencia de grupos o-acetilos en la cadena de ácido poli-D-manurónico. Apparently, estos sustituyentes ejercen un efecto protector sobre los residuos manurósilos contra la actividad epimerasa (Sutherland, 1990).

Como se observa en la figura 2.3, en *Azotobacter vinelandii*, el sustrato puede ser utilizado para la síntesis de alginato, la acumulación de polihidroxibutirato (PHB) o para la producción de biomasa y CO₂. Es importante señalar que, tanto la acumulación de PHB como la secreción de alginato están asociados con el proceso de enquistamiento del microorganismo y la síntesis de uno u otro metabolito va a depender principalmente de la tensión de oxígeno disuelto en el medio (Horan *et al.*, 1983; Brivonese y Sutherland, 1989; Anderson y Dawes, 1997).

II.4.- Factores que influyen en la síntesis de alginato

Los factores que afectan la síntesis de alginato por *A. vinelandii* han sido estudiados por diversos autores, tanto en cultivo en lote como en cultivo continuo. En la tabla 2.3 se presenta una revisión de las condiciones evaluadas en diversos estudios. En ésta se observa que los valores de pH que se han utilizado para la producción del polisacárido se encuentran entre 6.5 y 7.8, en intervalos de temperatura de 24 a 35°C.

El alginato es sintetizado por *A. vinelandii* a partir de diversas fuentes de carbono, incluyendo glucosa, fructosa, lactosa, maltosa, sacarosa, manitol, glicerol y sorbitol. De estos azúcares, se ha encontrado que la fructosa y el sorbitol promueven el crecimiento celular, pero son poco efectivos para la producción de alginato (Horan *et al.*, 1983). Mientras que con la glucosa, el manitol y la maltosa se observa el efecto inverso. Cuando se usa sacarosa como fuente de carbono, tanto la concentración de biomasa como el rendimiento de alginato se favorecen (Okabe *et al.*, 1981; Horan *et al.*, 1981). Por otra parte, la concentración inicial de carbohidratos influye sobre la producción de ácido algínico. Okabe *et al.* (1981), reportaron la inhibición de la síntesis de alginato asociado a un aumento de la biomasa del microorganismo a partir de una concentración de sacarosa inicial de 20 g/L. Un fenómeno similar fue observado por Tinoco (1993), ya que al incrementar la concentración inicial de sacarosa de 15 a 25 g/L, se manifestó un descenso importante en el rendimiento de alginato.

En relación al efecto del fosfato, sobre la producción de alginato, existen contradicciones en la literatura. Por una parte, en estudios realizados por Deavin *et al.* (1977), se reporta que cuando el microorganismo es crecido bajo condiciones de limitación de fosfato, la síntesis de alginato está asociada al crecimiento y termina cuando las células alcanzan la fase estacionaria. Un fenómeno distinto fue observado por Horan *et al.* (1981), usando una cepa mutante de *A. vinelandii*, quienes encuentran que la producción de alginato sufre un marcado incremento al inicio de la fase estacionaria en un cultivo limitado de fosfato (0.24 mM).

Tabla 2.3. Producción de alginato por *Azotobacter vinelandii*

| Cepa | Conc. Inicial de sacarosa (g/L) | Conc. Alginato (g/L) | pH | Temperatura (°C) | Tiempo de cultivo(h) | Sistema de cultivo | Rendimiento en base a sacarosa | Referencias |
|-------------------|---------------------------------|----------------------|-----|------------------|----------------------|-------------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| ATCC 12837 | 15 | 0.74 | 7.0 | 31 | 120 | | 0.049 | Cohen, 1963 |
| CDAO- 534 | 20 | 0.95 | 7.2 | 25 | 96-120 | Cultivo en lote (5 litros) | 0.0475 | Gorin y Spencer, 1966 |
| Cepa E | 20 | 2.4 | | 30 | 100 | | 0.120 | Larsen y Haug, 1971 |
| NCIB 9068 | 40 | 3.0 | 7.3 | 30 | 70 | Cultivo continuo (1 litro) | 0.0175 | Jarman <i>et al.</i> , 1978 |
| Mutante SM52B | 20 | 5.0 | 7.2 | 30 | 90 | Cultivo en lote en matraces | 0.250 | Horan <i>et al.</i> , 1981 |
| N-II-1-2 | 20 | 1.5 | 7.2 | 30 | 120 | Cultivo en lote en matraces | 0.075 | Okabe, <i>et al</i> 1981 |
| Mutante C-14 | 20 | 6.22 | 6.5 | 34 | 110 | Cultivo en lote en matraces | 0.311 | Chen <i>et al.</i> , 1985 |
| Cepa E | 20 | 1.38 | 7.0 | 30 | | Cultivo continuo (1 litro) | 0.069 | Annison y Couperwhite, 1986 |
| Cultivo "AX" | 40 | 6-7.5 | 7.8 | 30 | 150 | Cultivo en lote en matraces | 0.375 | Brivonese y Sutherland, 1989 |
| ATCC 9046 (WTC13) | | | | 29 | 72 | Cultivo en lote en matraces | 0.190 | Tinoco, 1993 |
| | 20 | 5.4 | 7.2 | 29 | 60 | Cultivo en lote (fermentador) | 0.270 | Tinoco, 1993 |

Por su parte, Annison y Couperwhite (1986) encontraron que la producción de alginato en cultivo continuo fue mayor usando 2.0 mM de fosfato, con respecto a cuando se usa un cultivo con limitación de fosfato (0.24 mM). Además, en altas concentraciones de fosfato (2.0 mM), el contenido de ácido gulurónico en la molécula es inferior a cuando se utilizan condiciones de limitación. Por su parte, Tinoco (1993) encontró una mayor producción de alginato en un cultivo de *A. vinelandii* en concentraciones de fosfato entre 2.5 a 5.0 mM, mientras que en concentraciones por arriba de 5.0 mM, se presentó una fuerte inhibición en la síntesis del polímero.

Azotobacter vinelandii sintetiza alginato en condiciones de fijación de nitrógeno. No obstante diversos autores han demostrado que la adición de algunas fuentes de nitrógeno al medio de cultivo favorece la producción de este polímero. Un ejemplo de lo anterior, es la comunicación de Larsen y Haug (1971), quienes encontraron que la adición de acetato de amonio al medio beneficia la síntesis de alginato.

Brivonese y Sutherland (1989), observaron que las fuentes orgánicas de nitrógeno (como la peptona y harina de soya) favorecen la producción de alginato; mientras que las fuentes inorgánicas de nitrógeno (como el nitrato), ejercen un efecto negativo sobre la síntesis de alginato. Tinoco (1993) reportó que el acetato de amonio y el extracto de levadura favorecen la producción de alginato en un cultivo en lote de *A. vinelandii*, mientras que la adición de cloruro o sulfato de amonio inhiben fuertemente la producción de biomasa y de polisacárido.

En las fermentaciones de alginato, es de particular importancia el mantener un control de la concentración de oxígeno disuelto en el medio, con el fin de incrementar la productividad del proceso e influir sobre la composición química del alginato. Lo anterior representa cierta dificultad ya que, durante la síntesis de alginato, se presentan diversos cambios reológicos del caldo de cultivo, principalmente en la viscosidad, los cuales inciden en la transferencia de oxígeno y de otros metabolitos (Jarman, 1979).

Bajo condiciones donde el suministro de oxígeno es limitado, las células de *A. vinelandii* acumulan en su interior polihidroxibutirato, el cual puede llegar a representar el 70 % del peso

celular (Stephenson *et al.*, 1978). En condiciones de alta oxigenación, este microorganismo incrementa su tasa de respiración específica y puede así transformar una gran proporción de la fuente de carbono a bióxido de carbono en un proceso energéticamente ineficiente (Jarman, 1979).

En un estudio realizado por Horan *et al* (1983), usando una cepa mutante de *Azotobacter vinelandii* encontraron que la cantidad de alginato producido fue dependiente de la concentración de oxígeno disuelto en el medio. Observaron que, manteniendo una saturación de oxígeno del 1 al 5%, se alcanza la más alta velocidad de síntesis del polímero. Paralelamente, las actividades de las enzimas clave (fosfomanosa- isomerasa, GDP-manosa-pirofosforilasa y GDP-manosa-deshidrogenasa) se incrementaron de manera significativa.

Por su parte Chen *et al.* (1985), observaron que la concentración de alginato y la viscosidad del caldo de cultivo fue mayor al aumentar la velocidad de agitación de 110 a 170 rpm. Por arriba de esta velocidad de agitación, la producción de alginato -y sobre todo la viscosidad- descenden drásticamente. Annison y Couperwhite (1986) encontraron que la cantidad de exopolisacárido producido por el microorganismo fue de 0.11 g/L usando flujos de aire de 100 mL/min, aumentando a 0.44 g/L en flujos de 300 mL/min y cayendo a 0.28 g/L en velocidades de aireación de 800 mL/min. Los mismos autores observaron que la proporción de residuos manurósilos y gulurósilos en la molécula de alginato no se afectaron con la aireación, mientras que el nivel de grupos acetatos en el polímero se vió influenciado por la velocidad de aireación, encontrándose un alto grado de acetilación en muestras aisladas de los cultivos mantenidos a altas tasas de aireación.

Brivonese y Sutherland (1989), reportan que, bajo condiciones de limitación de oxígeno, el microorganismo sintetiza preferentemente polihidroxiбутirato (PHB), mientras que en condiciones de exceso de oxígeno, la producción de alginato se incrementa. Tinoco (1993), reporta una máxima producción de alginato al mantener el oxígeno disuelto en un intervalo del 10 al 15% de saturación. No obstante, las propiedades reológicas del polímero se modifican, ya que la viscosidad del caldo disminuye en un 50% con respecto a la que se obtiene a bajas tasas de aireación.

Finalmente, debe subrayarse que no obstante la importancia del mezclado durante el proceso, es escasa la información acerca de la influencia de dicha variable sobre la producción y composición del alginato. Estudios realizados sobre la producción de otros polisacáridos, revelan que las condiciones hidrodinámicas imperantes en el biorreactor influyen de manera significativa sobre la concentración final de producto y sobre las características fisicoquímicas del mismo. Por ejemplo, en el caso de la producción del polisacárido microbiano pululano (con *Aureobasidium pullulans*), se ha encontrado que los mayores rendimientos en la síntesis del polímero se obtienen cuando se opera el reactor a bajas velocidades de deformación, en combinación con bajas concentraciones de oxígeno disuelto en el medio (Gibbs y Seviour, 1996).

Por el contrario, en el caso del β ,1,3-glucano (curdlano), Lawford y Rousseau (1991) observaron un incremento en la síntesis del polisacárido bajo condiciones de alto esfuerzo de corte; sin embargo, la capacidad viscosificante del polímero, disminuye bajo las mismas condiciones. Recientemente, estudios realizados sobre la producción de gelano revelan la influencia de las condiciones hidrodinámicas, sobre el comportamiento reológico del caldo de cultivo, las cuales están asociadas a diferencias en las propiedades fisicoquímicas del polímero (Dreveton, *et al.*, 1994). En el caso del alginato, el único estudio en donde se plantea la relación entre las condiciones hidrodinámicas del fermentador y la síntesis del producto es el de Horan *et al* (1983), quienes observaron que un cultivo continuo de *A. vinelandii* hay una disminución en el contenido del polímero, debido al estrés causado a las células por la agitación en un cultivo prolongado.

III OBJETIVOS

GENERAL

Estudiar el efecto de la tensión de oxígeno disuelto y la velocidad de agitación sobre la biosíntesis y composición del alginato en un cultivo en lote de *Azotobacter vinelandii*.

PARTICULARES

- 1) Evaluar el efecto de condiciones extremas de aireación/agitación en matraces agitados sobre la producción de alginato y polihidroxibutirato (PHB) y sobre la distribución de pesos moleculares y el grado de acetilación del polímero.
- 2) Analizar la influencia independiente de la tensión de oxígeno disuelto y la velocidad de agitación sobre la cinética de crecimiento la producción de alginato y PHB en un cultivo en lote de *Azotobacter vinelandii*.
- 3) Determinar el peso molecular y el grado de acetilación de los diferentes alginatos obtenidos por fermentación en condiciones controladas de oxígeno disuelto y agitación.

CAPITULO 2

I PRESENTACION DEL ARTICULO

Los resultados obtenidos en la primera etapa del estudio se incluyen en el artículo: “**Changes in alginate molecular mass distributions, broth viscosity and morphology of *Azotobacter vinelandii* cultured in shake flasks**”, publicado en la revista *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 48:510-515, 1997. En este trabajo, se reporta la influencia de dos condiciones extremas de aireación/agitación sobre la producción y evolución del peso molecular del alginato y sus propiedades reológicas. Así también, se analizan las variaciones morfológicas de *A. vinelandii* durante el cultivo. Los resultados de dicho trabajo, evidenciaron que, condiciones de baja aireación/agitación promueven la síntesis de alginato e influyen positivamente en el peso molecular final del producto. Como consecuencia, el producto sintetizado bajo estas condiciones, presentó una mayor capacidad viscosificante- en relación al producto comercial aislado de *Macrocystis pyrifera*-.

Por otra parte, se reporta en este artículo, como la morfología de *Azotobacter vinelandii* cambia en respuesta a las diferentes condiciones de aireación/agitación del cultivo y como éstos cambios están estrechamente relacionados con la acumulación de polihidroxibutirato (PHB). Finalmente, los resultados generados en este artículo, revelaron la necesidad de llevar a cabo estudios posteriores, a nivel de fermentador, en condiciones estrictamente controladas de oxígeno disuelto y velocidad de agitación y de esta manera poder analizar el efecto independiente de cada una de estas variables, sobre la producción y composición del alginato.

ORIGINAL PAPER

C. Peña · N. Campos · E. Galindo

Changes in alginate molecular mass distributions, broth viscosity and morphology of *Azotobacter vinelandii* cultured in shake flasks

Received: 13 December 1996 Received revision: 10 April 1997 Accepted: 27 April 1997

Abstract The effect of different aeration conditions during the culture of *Azotobacter vinelandii* on the production and molecular mass of alginate was evaluated in shake flasks. In baffled flasks, the bacteria grew faster and produced less alginate (1.5 g l) than in conventional (unbaffled) flasks (4.5 g l). The viscosity of the culture broth was also influenced by the type of flask. Higher final viscosities were attained in unbaffled flasks (520 cP (520 mPa s)) as compared to baffled flasks (30 cP). This latter phenomenon was closely related to the changes in the molecular mass distribution. In either cases, the mean molecular mass increased with culture age; however, at the end of the fermentation, the mean molecular mass of the alginate obtained in unbaffled flasks was fivefold higher than that obtained in baffled flasks. As the culture proceeded, the cells of *Azotobacter* grown in unbaffled flasks increased in diameter, whereas those cultured in baffled flasks decreased in size.

Introduction

Alginates are linear copolymers of β -D-mannuronic acid and its C-5 epimer, α -L-guluronic acid, arranged in irregular blocks along the linear chain. The rheological and gel-forming properties of alginate depend on the molecular mass distribution and on the relative content of the two monomers (Geddie and Sutherland 1994). The main industrial applications of alginates are as thickeners, stabilizers, gelling agents and emulsifiers in the food, textile, and pharmaceutical industries. Alginates have also been employed widely for immobilizing living cells and enzymes (Sutherland 1990). Commercial alginates are currently extracted from marine algae such

as *Laminaria* and *Macrocystis*. Alginate can also be obtained from the culture of bacterial sources, namely *Azotobacter vinelandii* and various species of *Pseudomonas*. Nevertheless, only *A. vinelandii* produces an alginate with contiguous sequences of L-guluronic acid residues, similar to the algal alginate (Skjak-Braek et al. 1986).

Alginate production by *A. vinelandii* has been studied both in batch and continuous culture (Horan et al. 1983; Chen et al. 1985; Annison and Couperwhite 1986; Brivonese and Sutherland 1989). Under low dissolved oxygen concentrations, the organism accumulates the intracellular storage polymer poly-(β -hydroxybutyrate) whereas, at high dissolved O_2 , *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 (Annison and Couperwhite 1986).

The aeration conditions also affect the composition of alginate produced by *A. vinelandii* (Annison and Couperwhite 1986). These authors reported that the level of acetate groups on the polymer increased at higher aeration rates, whereas the uronate composition of alginate isolated from the cultures was independent of aeration rate. Leitao and Sa-Correia (1993) reported that the dissolved O_2 concentration affected the molecular mass of the alginate produced by *Pseudomonas aeruginosa*. This group found that high dissolved O_2 (70% of saturation) led to a polymer with high molecular mass. For other polymers, such as xanthan, it has been reported that the proportion of high-molecular-mass polymers increased as the dissolved O_2 level increased (Flores et al. 1994).

Although previous studies have revealed the importance of oxygen during the production of alginate, no systematic study has been reported documenting how the molecular mass distribution of the polymer, together with their rheological characteristics, change as a function of aeration conditions. It is important to determine the effect of aeration conditions in shake flasks as these devices (in which dissolved O_2 is generally not

C. Peña · N. Campos · E. Galindo (✉)
Departamento de Biotecnología, Instituto de Biotecnología,
Universidad Nacional Autónoma de México,
Apdo Post. 510-3, Cuernavaca 62250, Morelos, México

controlled) are widely used for screening proposes as well for testing fermentation media and conducting studies on microbial physiology.

The aim of this study was to evaluate the effect of different aeration conditions in shake flasks (by using conventional and baffled flasks) on alginate production and its molecular mass distributions as well as on the viscosity of resuspensions of the polymer produced by a wild-type *A. vinelandii*. In addition, morphological variations in *A. vinelandii* were followed during the culture.

Materials and methods

Microorganism

The bacterial strain used in this work was *Azotobacter vinelandii* ATTC-9046. This was maintained by monthly subculture on Burk's agar slopes and stored at 4 °C.

Culture medium and growth conditions

A. vinelandii was grown in a modified Burk's medium of the following composition (in g/l): sucrose 20, yeast extract (Difco) 3, K_2HPO_4 0.66, KH_2PO_4 0.16, MOPS 1.42, $CaSO_4$ 0.05, NaCl 0.2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.0029, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.027. The pH was adjusted to 7.2 with a concentrated NaOH solution. To avoid precipitation during autoclaving, the solutions of $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ and $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ were separated from the other medium components during sterilization (121 °C, 35 min). Fermentations were carried out during 72 h of incubation in 500-ml unbaffled (conventional conical) and baffled (conical with three lateral indentations) flasks (Serrano-Carreón et al. 1995) containing 100 ml of liquid medium at 200 rpm and 29 °C in an incubator shaker (New Brunswick Sci. Series 25). Two flasks were removed every 12 h for analytical measurements. The results given are the means of two independent runs.

Analytical determinations

Biomass growth and morphology

Cell number and the cellular size distribution were monitored during the fermentation using a Coulter counter (Coulter Multisizer II). Samples of the culture broth were diluted 1:1000 (v/v) with an isotonic solution and then measured using a tube of 50 µm aperture. Cell diameter and volume were determined on the basis of the equation provided by the manufacturer (Acc.Comp. Multisizer II software) assuming a spherical shape for the particles. Preparations of *A. vinelandii* were stained with Gram's chemicals and the morphology was observed by optical microscopy (Nikon type 104) at 100× magnification.

Alginate

Alginate concentration was determined as follows. A 10-ml sample of culture broth was mixed with 1 ml Na_2EDTA (0.1 M) and 1 ml NaCl (1.0 M) and then centrifuged at 12 000 rpm (Beckman J2-HS) during 20 min. The supernatant was added to 30 ml propan-2-ol and the mixture was shaken vigorously. After 10 min, the resultant precipitate was filtered through a Whatman filter-paper (Qualitative no. 1) and dried at 70 °C for 24 h. Algal alginate (from *Macrocystis pyrifera*) used in this work was obtained from Sigma.

Viscosity measurement

The viscosity of the culture broth was measured in a cone plate viscosimeter (Wells-Brookfield LVT, series 82198). All the deter-

minations were carried out at room temperature (25 °C) and 6 rpm using cone CP-52 which, according to the instrument manufacturer, corresponds to a shear rate of $12 s^{-1}$.

Poly(β -hydroxybutyrate)

The method was adapted from the extraction procedure reported by Hahn et al. (1993), and a spectrophotometric assay described elsewhere (Law and Slepecky 1961). A 2.5-mg sample of vacuum-dried cells was treated with a mixture of 1 ml chloroform and 1 ml diluted hypochlorite solution (30% v/v). After treatment at 30 °C for 1 h, the dispersion was centrifuged in an analytical centrifuge (Becton Dickinson, Dynac II) at 5000 rpm for 10 min. The upper phase (hypochlorite solution) was decanted and the chloroform (lower phase) was separated from the cellular debris by filtration on Whatman filter-paper (Qualitative no. 1). The chloroform containing poly(β -hydroxybutyrate) granules was transferred to boiling tubes and held at 70 °C until the chloroform had fully evaporated, then 10 ml concentrated H_2SO_4 was added. The tubes were capped with glass marbles and held in a boiling water bath for 10 min to hydrolyze the poly(β -hydroxybutyrate) to crotonic acid. Finally, the solution was cooled and the absorbance was measured at 235 nm in a spectrophotometer (Beckman DU, model 650) against a sulfuric acid blank. The amount of poly(β -hydroxybutyrate) was calculated extrapolating the absorbance values using a standard curve.

Characterization of the alginate

Molecular mass distribution

The alginate molecular mass distribution was estimated by gel-permeation chromatography with a serial set of Ultrahydrogel columns (UG 500 and 2000, Waters), using a conventional HPLC system with a differential refractometer detector (Waters, 410). The eluant was 0.1 M $NaNO_3$ at 40 °C at a flow rate of 0.9 ml/min. The detector signal was processed with PC-compatible software (Maxima GPC, Waters). The columns were calibrated by a standard calibration method using pullulans of *Aureobasidium pullulans* as standards of molecular mass. Alginates samples were filtered through a 0.22-µm Millipore membrane to remove microgels and cellular debris. A volume of 50 µl was injected into the HPLC via a sample loop.

Acetyl determination

The acetyl content of the various alginates, expressed as acetate content, was determined as described elsewhere (Mc Comb and Mc Cready 1957), using β -D-glucose pentaacetate (Sigma) as standard. Results are the average of at least three independent determinations.

Results

Bacterial growth and alginate production

Figure 1a shows the growth kinetics of *A. vinelandii* in unbaffled and baffled flasks. In both cases, no lag phase could be observed clearly. A higher maximum cell concentration was achieved in the baffled flasks. Under these conditions, the specific growth rate was $0.15 h^{-1}$ with a maximum biomass of 16×10^8 cell/ml, compared to $0.09 h^{-1}$ and 8×10^8 cell/ml observed in the unbaffled flasks. In unbaffled flasks, the pH dropped from 7.2 to 5.3 probably because of the alginic acid excretion and

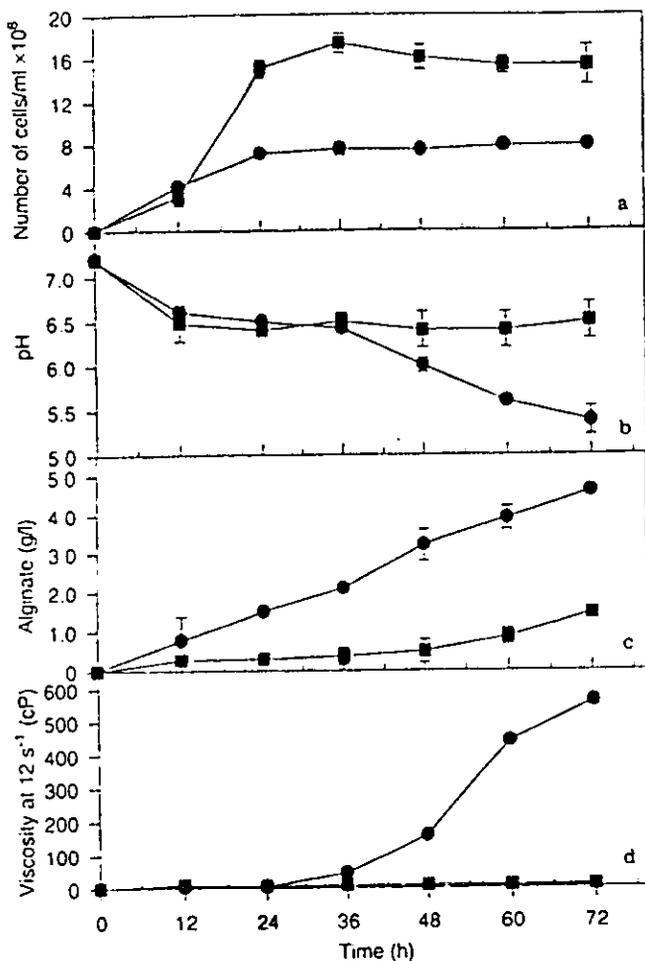


Fig. 1 Kinetics of biomass growth (a), pH (b), alginate production (c) and viscosity changes in the broth (d) of cultures of *Azotobacter vinelandii* grown in baffled (■) and unbaffled flasks (●) ($1 \text{ cP} = 1 \text{ mPa s}$)

other metabolites produced. In the case of baffled flasks, the pH initially dropped from 7.2 to 6.7 during the first 24 h of culture; later, the pH was constant at about 6.5 throughout the fermentation (Fig. 1b).

Figure 1c shows the evolution of alginate during the course of the culture in the two types of flasks. A maximum alginate concentration of 4.5 g/l was obtained in the conventional flasks after 72 h of culture, whereas only 1.4 g/l alginate was produced in baffled flasks at the same time. In the unbaffled flasks, the alginate production was partially growth-associated and an important fraction of the total alginate synthesis took place in the stationary growth phase. In baffled flasks, *A. vinelandii* yielded the highest amount of polysaccharide at the end of the stationary phase.

The viscosity of the culture broth was also influenced by the aeration conditions: the highest viscosity of the culture broth was obtained in conventional flasks [520 cP (520 mPa s)], after 72 h of fermentation, whereas with baffled flasks, the viscosity was only 7.6 cP (Fig. 1d).

Characterization of the polymer

The characteristics of the polysaccharides obtained under the two sets of culture conditions varied considerably. The alginate produced in conventional flasks formed a large mass, which could be easily recovered from the top of the isopropanol water mixture. In contrast, the product obtained from the baffled flasks yielded a precipitate containing thin fibers. The visually different properties seen during product recovery certainly reflected differences in the physical properties of the alginates. As the molecular mass distribution and composition of the alginate are critical parameters that affect the rheological behavior, these properties were characterized in polymers obtained from the two fermentation systems.

The effect of alginate concentration on the viscosity of bacterial and algal alginate (from *M. pyrifer*) solutions is shown in Fig. 2. Clearly, the polymers synthesized in the cultures performed in the different flasks were rheologically different. For example, for a 6 g/l solution, the viscosity (measured at 12 s^{-1}) of the alginate produced in unbaffled flasks was 560 cP, whereas the polymer obtained from baffled flasks showed a viscosity of 30 cP. On the other hand, the viscosity of the alginate produced in conventional flasks was fivefold higher than the viscosity exhibited by the algal alginate at the same polymer concentration.

The molecular mass distributions of the alginates obtained at various stages of the culture conducted in the two different flasks, as well as the data for the alginate from *M. pyrifer*, are shown in Fig. 3. The molecular mass distribution of alginates obtained under the two sets of aeration conditions were very different. In both types of flask, the mean molar mass increased during culture. The mean molar mass of alginate produced during the growth phase in baffled flasks was $0.17 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$ and this increased to $0.4 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$ at

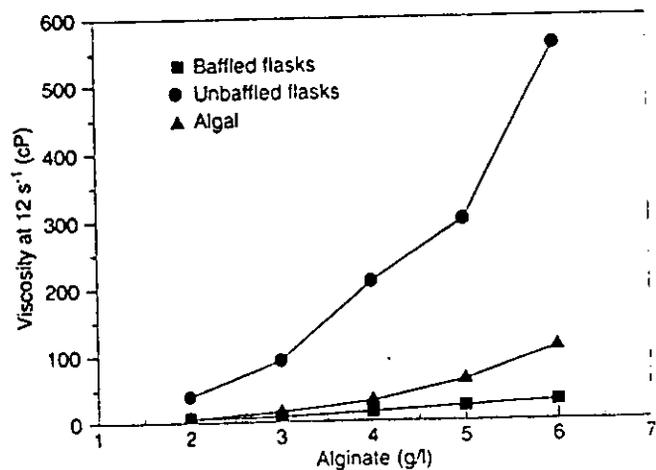


Fig. 2 Viscosity as a function of concentration of bacterial and algal alginates. Bacterial alginate solutions were prepared with the polymer obtained after 72 h of cultivation ($1 \text{ cP} = 1 \text{ mPa s}$)

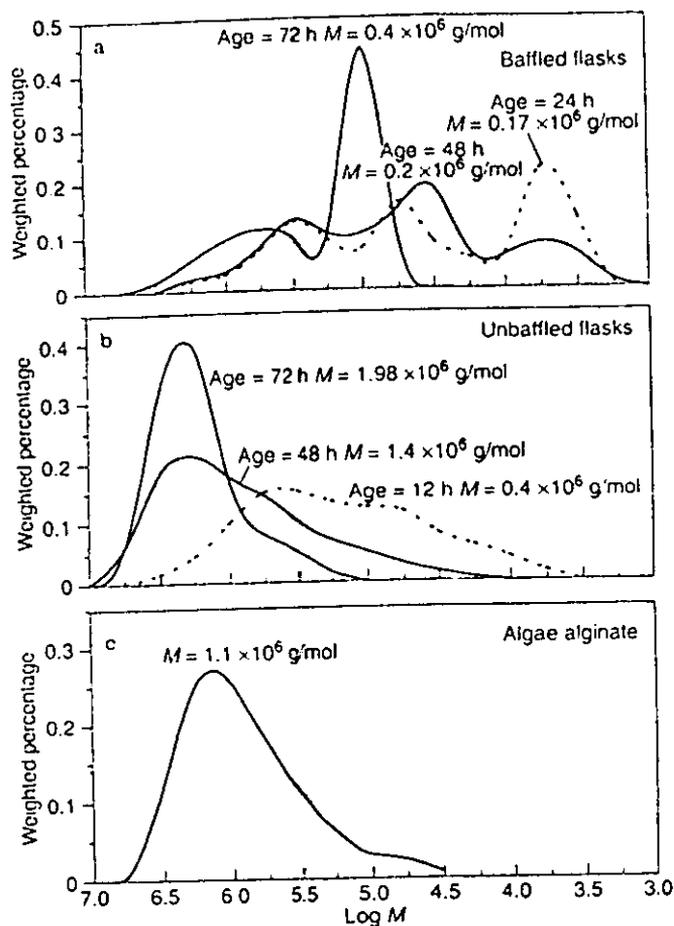


Fig. 3 Changes in molar mass (M) distributions of alginate during culture in baffled (a) and unbaffled (b) flasks and molar mass distribution of algal alginate from *Macrocystis pyrifera* (c)

the end of the fermentation. In the case of alginate isolated from cultures conducted in unbaffled flasks, the mean molar mass at the beginning of the exponential growth phase was 0.4×10^6 g/mol and this increased rapidly to high values (1.4×10^6 – 1.98×10^6 g/mol) during the stationary phase.

When the polymers were analyzed at the end of the fermentation (isolated after 72 h of cultivation), mainly products of high molar mass were obtained from the cultures carried out in conventional flasks. The mean molar mass was 1.98×10^6 g/mol, with a polydispersity index (PI) of 1.50. The mean molar mass of the seaweed polymer was 1.1×10^6 g/mol with a PI of 2. On the other hand, alginate isolated from cultures carried out in baffled flasks showed a high proportion of low-molar-mass fractions ($\bar{M} = 0.4 \times 10^6$ g/mol and PI = 2.70).

Morphology of *A. vinelandii*

As shown in Fig. 4a, significant differences in cell dimensions and cell morphology were observed, depending upon the flask used. In unbaffled flasks, the mean

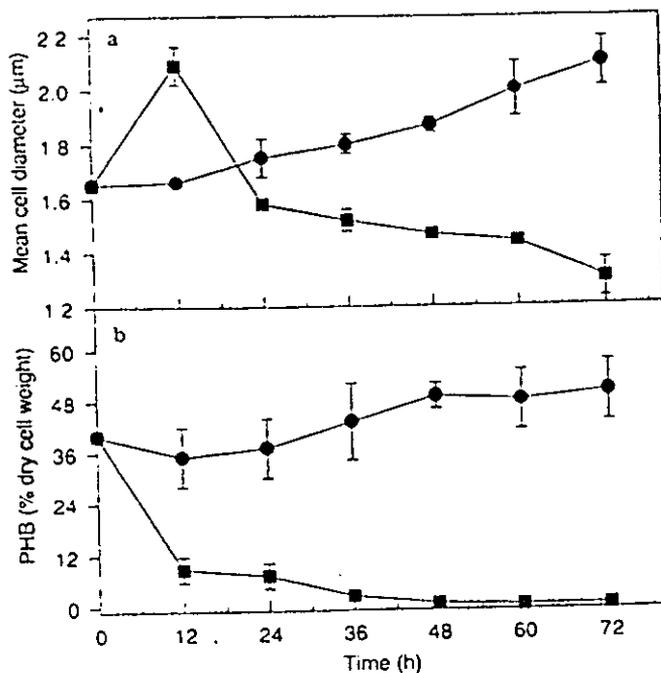


Fig. 4 Mean cell diameter of *A. vinelandii* (a) and poly(β -hydroxybutyrate) (PHB) accumulation (b), during fermentations conducted in baffled (■) and unbaffled flasks (●)

cellular diameter of *A. vinelandii* increased during the culture from 1.7 μm (at 12 h) to 2.1 μm (at 60 h). This increase was closely related to the accumulation of intracellular poly(β -hydroxybutyric acid), which in this case comprised up to 50% (w/w) of the cell dry weight (Fig. 4b). In contrast, in baffled flasks, the cell size increased during the first 12 h. Later, the diameter of the bacteria decreased from 2.1 μm to 1.3 μm at the end of the fermentation. In this case, the reduction in the cell dimensions could be partially explained by the drop in the poly(β -hydroxybutyrate) content. Observations under the microscope indicated that most of the cells grown in conventional flasks were quite spherical whereas, in baffled flasks, practically all cells were oval-shaped. In addition, the cells grown in conventional flasks presented a thick slime layer, which very likely is related to the alginate content.

Discussion

The results illustrated in Fig. 1a show that the culture grew faster in baffled flasks (specific growth rate, $\mu = 0.15 \text{ h}^{-1}$) than in unbaffled flasks ($\mu = 0.09 \text{ h}^{-1}$). This was a clear indication that bacterial growth in conventional flasks was oxygen-limited, as baffled flasks allow better oxygenation compared with unbaffled ones (van Suijdam et al. 1978; Galindo et al. 1993). In contrast, a higher alginate concentration was obtained under low aeration conditions (conventional flasks, Fig. 1c). This phenomenon might be related to the

sensitivity to oxygen of the key enzymes of alginate biosynthesis in *A. vinelandii*. Horan et al. (1983) have found that the activities of phosphomannose isomerase and GDP-mannose pyrophosphorylase increased between dissolved O₂ concentrations of 1% and 5% saturation and then decreased at higher O₂ levels. Our results are in agreement with those reported by Chen et al. (1985), who indicated that the alginate concentration was highest at 170 rpm (for a range of 110–200 rpm) in a culture of *A. vinelandii* conducted in shake flasks. A further increase in shaking speed (i.e. higher aeration) was unfavorable for alginate production. On the other hand, in the work reported by Clementi et al. (1995), it was observed that the rate of alginate synthesis rapidly declines to zero as a result of a drastic drop in pH in a culture of *A. vinelandii*. However, in this study, the alginate formation rate (see Fig. 1c) was not affected by the drop in the pH experienced in the stationary phase.

As shown in Fig. 1d, the viscosity of the culture broth was higher when the aeration conditions were lower. This suggests an important effect of oxygen on the molecular characteristics (i.e. molecular mass) of the product. It is known that the viscosity of alginate solutions is strongly influenced by the molecular mass distribution (Martinsen et al. 1991) and, to a lesser extent, by the content and distribution of the two monomers in the alginate molecule (Martinsen et al. 1991). However, no previous data have been published on the viscosity of the culture broths under different culture conditions.

The results in Fig. 2 show that, depending upon the culture conditions, the bacterial alginate can exhibit properties that could make it similar or better than the algal polysaccharide. This suggests that environmental conditions could be controlled in order to produce an alginate with rheological properties matching (or even improving on) those of alginates used nowadays in the hydrocolloid market (from marine algae). Our experiments showed that lower aeration conditions (conventional flasks) promoted the synthesis of a polymer of better rheological quality in terms of its viscosity. As it will be shown below, this is closely related to the molecular mass distribution of the different products.

Figures 3a,b show that the mean molecular mass of the alginate increased with the age of the culture. The increase of the mean molecular mass of the alginate might be partly the result of the polymerization of the molecule during culture by the action of polymerases. Furthermore, it is known that the alginate molecules under some conditions may form calcium-mediated associations, which increase with the age of the culture (Annison and Couperwhite 1986). Therefore, the molecular association between alginate chains through interactions of polyguluronate residues mediated by divalent cations (Ca²⁺ and Mg²⁺) could lead to an increase in the hydrodynamic volume and thus in the molecular mass of the alginate. This is the first time that the influence of different aeration conditions on the molecular mass distribution and on the mean molecular mass of alginate has been reported.

It has been reported (Annison and Couperwhite 1986) that the degree of acetylation of alginate produced by *A. vinelandii* is influenced by the aeration rate. However, we found that the degree of acetylation of alginates isolated from the cultures was independent of the aeration conditions. In both sets of reaction conditions (baffled or unbaffled flasks), the content of acetyl residues was about 1% (g acetyl/100 g alginate), which could be related to a high proportion of guluronate residues in the molecule, because the acetyl groups are associated exclusively with the mannuronate residue (Skjak-Braek et al. 1986).

On the other hand, the higher molecular mass obtained in low aeration conditions suggests that the polymerization activity of *A. vinelandii* can be highly sensitive to oxidative inactivation. In contrast to this, for *P. aeruginosa*, Leitao and Sa-Correia (1993) reported that the molecular mass of the polymer synthesized by this bacterium increased at higher levels of aeration, suggesting that the regulation of biosynthesis is very different in *Azotobacter* and *Pseudomonas*.

As the mean molecular mass of the alginate increases during culture, it appears unlikely that the alginase of *A. vinelandii* plays an important role in polymer synthesis in shake flasks. On the other hand, it has been reported that the activity of the lyase enzyme was significantly lower in shake flasks than in fermentor cultures of *A. vinelandii* and *P. mendocina* (Horan et al. 1983; Sengha et al. 1989). Our results contrast with those reported by Conti et al. (1994) for the alginate produced by *Pseudomonas fluorescens*. They found that the molecular mass of alginate decreased with the age of the culture, suggesting that, in older cultures, either a polymer of lower molecular mass is produced, or more probably, that the polymer was degraded. There is a possibility that the degradation of the polymer by alginate lyases could occur in older cultures; however, Conti et al. (1994) showed that, when the alginate produced by this strain was used, it proved to be poor substrate for the lyases isolated.

Although it has been reported that *A. vinelandii* increases its cellular volume by increasing the number and size of the poly(β -hydroxybutyrate) granules (Lin et al. 1978) and that *A. vinelandii* formed intracytoplasmatic membrane intrusions and increased its cell volume as a response to increased aeration of the medium (Post et al. 1982), no previous study involving an analysis of populations of *A. vinelandii* has been carried out to investigate the influence of different aeration conditions on the morphology of *Azotobacter* and its relation with alginate production and poly(β -hydroxybutyrate) biosynthesis. Our data indicated that the morphology of *A. vinelandii* changes in response to the different dissolved oxygen profiles expected in the cultures. The cells grown in unbaffled flasks were larger than those grown in baffled flasks and they were quite spherical and presented a thick slime layer. In order to obtain a preliminary determination of the proportion of the external layer in relation to the total cell volume, the cells were

thoroughly washed twice with physiological solution and analyzed again in the Coulter counter. The results suggest that, under milder aeration conditions (conventional flasks), the matrix around the cells can represent up to 40% of the total cell volume (as measured by the Coulter counter) during the stationary phase of growth. In the cells grown under conditions of better aeration (baffled flasks), the external layer can constitute less than 20% of the total cell volume. It is important to point out that the presence of a polysaccharide matrix around the cells could limit their mobility as well as hinder substrate and product exchange with the environment. This situation might cause local oxygen limitation and thus lead the bacterium to accumulate larger amounts of alginate and intracellular poly(β -hydroxybutyrate).

Acknowledgements This work was partially financed by DGAPA UNAM (grant IN-506494).

References

- Annisson G, Couperwhite I (1986) Influence of calcium on alginate production and composition in continuous cultures of *A. vinelandii*. *Appl Microbiol Biotechnol* 25: 55-61
- Brivonese A, Sutherland I (1989) Polymer production by a mucoid strain of *Azotobacter vinelandii* in batch culture. *Appl Microbiol Biotechnol* 30: 97-102
- Chen W, Chen J, Chang S, Su C (1985) Bacterial alginate produced by a mutant of *Azotobacter vinelandii*. *Appl Environ Microbiol* 49: 543-546
- Clementi F, Fantozzi P, Mancini F, Moresi M (1995) Optimal conditions for alginate production by *Azotobacter vinelandii*. *Enzyme Microb Technol* 17: 983-988
- Conti E, Flaibani A, O'Reagan M, Sutherland W (1994) Alginate from *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida*: production and properties. *Microbiology* 140: 1125-1132
- Flores F, Torres G, Galindo E (1994) Effect of the dissolved oxygen tension during cultivation of *N. campestris* on the production and quality of xanthan gum. *J Biotechnol* 34: 165-173
- Galindo E, Salcedo G, Flores C, Ramirez ME (1993) Improved shake flask test for the screening of xanthan-producing microorganisms. *World J Microbiol Biotechnol* 9: 122-124
- Geddie J, Sutherland I (1994) The effect of acetylation on cation binding by algal and bacterial alginates. *Biotechnol Appl Biochem* 20: 117-129
- Hahn S, Chang Y, Kim B, Lee K, Chan H (1993) The recovery of poly(β -hydroxybutyrate) by using dispersions of sodium hypochlorite solution and chloroform. *Biotechnol Tech* 7: 209-212
- Horan N, Jarman T, Dawes E (1983) Studies of some enzymes of alginic acid biosynthesis in *Azotobacter vinelandii* grown in continuous culture. *J Gen Microbiol* 107: 59-64
- Law H, Slepecky R (1961) Assay of poly- β -hydroxybutyric acid. *J Bacteriol* 82: 33-36
- Lentao J, Sa-Correira I (1993) Oxygen-dependent alginate synthesis and enzymes in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gen Microbiol* 139: 441-445
- Lin P, Pankratz S, Sadoff L (1978) Ultrastructural and physiological changes occurring upon germination and outgrowth of *Azotobacter vinelandii* cysts. *J Bacteriol* 135: 641-646
- Martinsen A, Skjak-Braek G, Smidsrod O, Zanetti F, Paoletti S (1991) Comparison of different methods for determination of molecular weight and molecular weight distributions of alginates. *Carbohydr Polym* 15: 171-193
- Mc Comb A, Mc Cready R (1957) Determination of acetyl in pectin and in acetylated carbohydrate polymers. *Anal Chem* 29: 819-821
- Post E, Golecki R, Oelze J (1982) Morphological and ultrastructural variations in *Azotobacter vinelandii* growing in oxygen-controlled continuous culture. *Arch Microbiol* 133: 75-82
- Sengha S, Anderson J, Hacking J, Dawes A (1989) The production of alginate by *Pseudomonas mendocina* in batch and continuous culture. *J Gen Microbiol* 135: 795-804
- Serrano-Carreón L, Salcedo G, Ramirez ME, Galindo E (1995) Kinetics and broth rheology evolution during xanthan production by *Xanthomonas campestris* cultured in shake flasks. *Asia Pac J Mol Biol Biotechnol* 3: 67-73
- Skjak-Braek G, Grasdalem H, Larsen L (1986) Monomer sequence and acetylation pattern in some bacterial alginates. *Carbohydr Res* 154: 239-250
- Sutherland I (1990) *Biotechnology of microbial exopolysaccharides*. Cambridge University Press, Cambridge New York
- van Suijdam J, Kossen WF, Joha A (1978) Model for oxygen transfer on shake flasks. *Biotechnol Bioeng* 20: 1695-17

CAPITULO 3

Producción y composición del alginato sintetizado por *Azotobacter vinelandii* bajo condiciones controladas de oxígeno disuelto y velocidad de agitación

I.1-Influencia de la tensión de oxígeno disuelto (a velocidad de agitación constante)

Una de las preguntas centrales planteadas en el presente trabajo fue: ¿de que manera el oxígeno disuelto afecta la síntesis y composición de la alginato, independientemente de la influencia que pudieran tener otras variables como la velocidad de agitación?. Para esto, se llevaron a cabo cultivos en fermentador en donde se controló la tensión de oxígeno disuelto (TOD) de los cultivos (en el rango de 0.5 a 5%) variando la presión parcial de oxígeno y nitrógeno en los gases de entrada (ver apéndice metodológico), a una velocidad de agitación constante de 300 rpm. Los detalles sobre la técnicas utilizadas en esta parte del estudio son descritas en detalle en el apéndice metodológico.

En la figura 3a se muestra como, a través del sistema de adquisición y control de datos de la fermentación, fue posible mantener niveles de oxígeno disuelto a lo largo del cultivo muy cercanos a los “set points” establecidos, los cuales fueron de 0.5, 1, 3, y 5% de TOD, sin necesidad de manipular otras variables como la velocidad de agitación o el flujo de gases.

Los resultados del estudio confirman la importancia del oxígeno disuelto durante el crecimiento de *A. vinelandii*. En la figura 3.2a se aprecia como, un aumento en la TOD (en el rango de 0.5 a 5%) provoca un incremento en la velocidad de crecimiento del microorganismo, alcanzándose una velocidad específica de crecimiento (μ) de 0.20 h^{-1} con una concentración máxima de biomasa de 4.6 g/L en los cultivos desarrollados al 5% de oxígeno disuelto (tabla 3.1). Con base en las velocidades de crecimiento observadas, se calculó, a través del modelo de Monod, una velocidad máxima de crecimiento (μ_{max}) de 0.25 h^{-1} y un valor de K_s (definida como la concentración de oxígeno disuelto en la cual la velocidad de crecimiento es la mitad de la velocidad máxima) de 1.22 % (0.08 mg/L de oxígeno). Por otra parte, se estimó una concentración crítica para oxígeno de 4% (0.26 mg/L). Este último valor, difiere del reportado por Finn (1954), el cual es de 1.6 mg/L. Las

Este último valor, difiere del reportado por Finn (1954), el cual es de 1.6 mg/L. Las diferencias entre este valor y el valor reportado en el presente estudio pudieran deberse a que dichos autores usaron como base de la determinación la velocidad de respiración de la bacteria y no la velocidad de crecimiento. Este factor puede ser particularmente importante en *A. vinelandii*, ya que la respiración en esta bacteria es usada para la remoción de oxígeno con el propósito de proteger su sistema de nitrogenasa, además de ser utilizado como aceptor de electrones en el crecimiento celular.

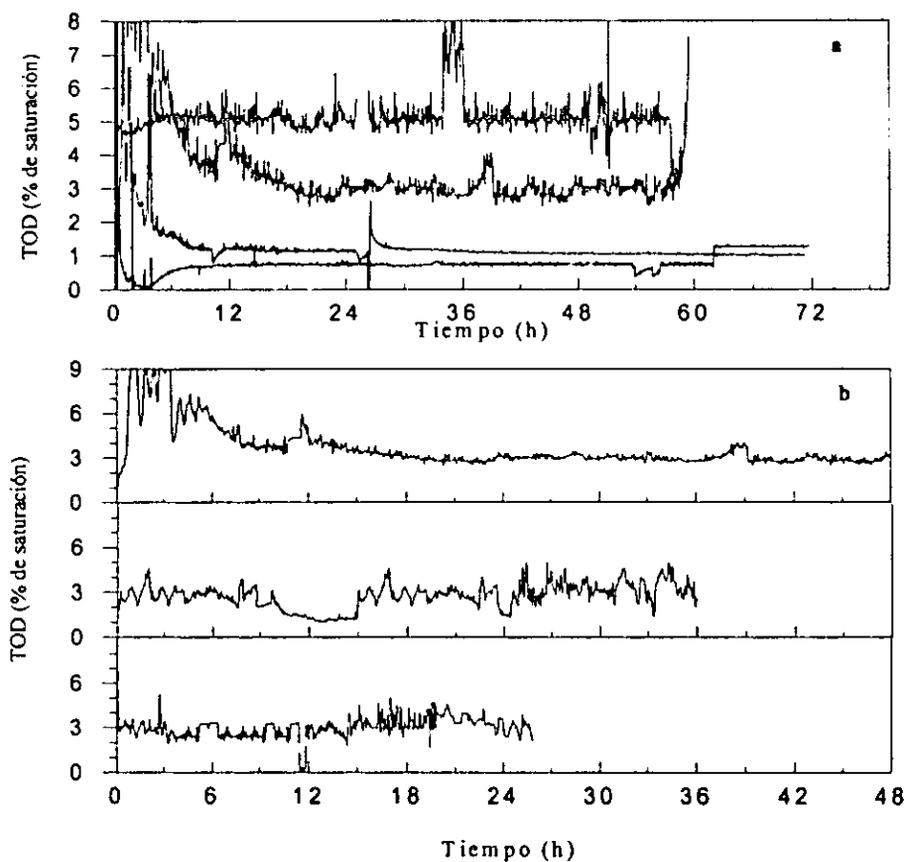


Figura 3.1. Perfiles típicos de oxígeno durante el cultivo de *Azotobacter vinelandii* a diferentes "set points" de oxígeno disuelto a una velocidad de agitación constante de 300 rpm (a) y a diferentes velocidades de agitación a TOD constante del 3%.

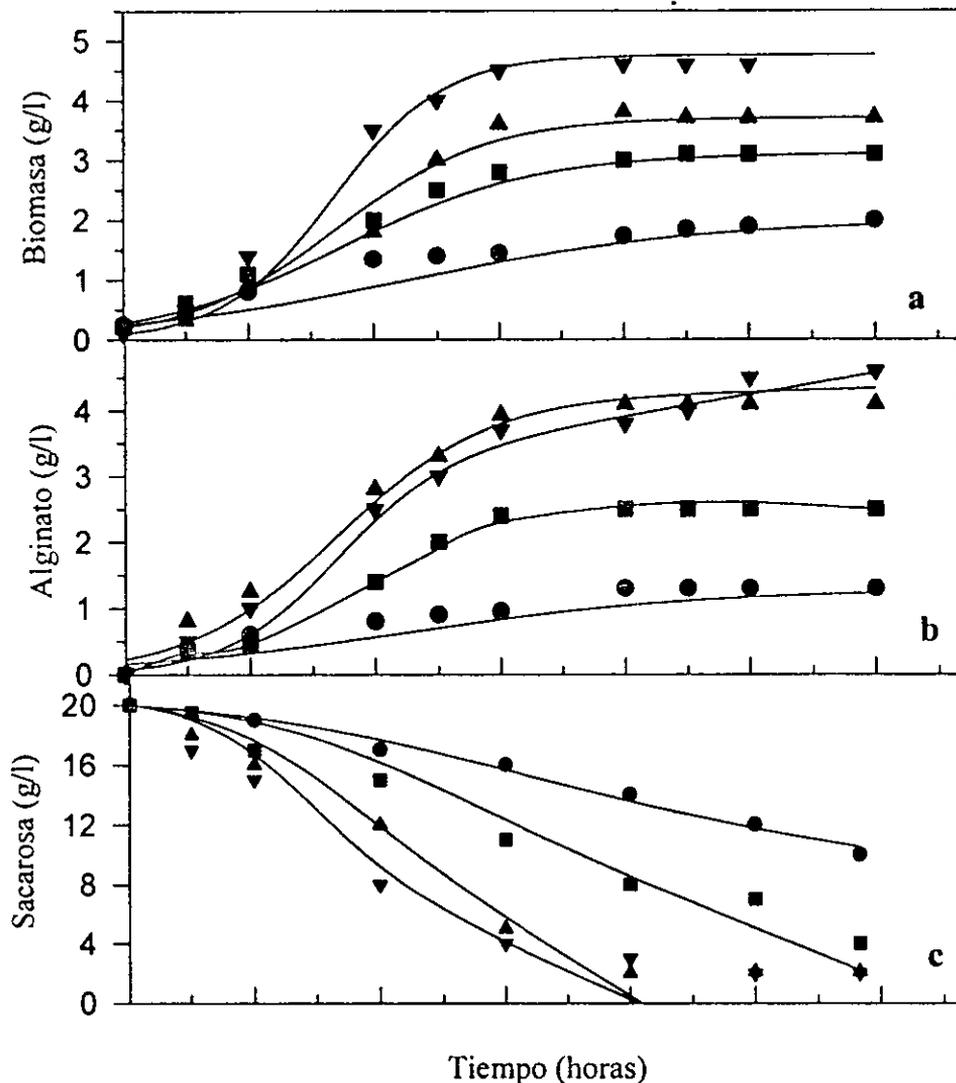


Fig 3.2. Influencia de la tensión de oxígeno disuelto sobre el crecimiento celular (a), la producción de alginato (b) y el consumo de sacarosa (c), durante el cultivo de *A. vinelandii* a 0.5% (●), 1.0 % (■), 3% (▲) y 5% (▼) de TOD. Las líneas en los paneles a, b y c representan el ajuste del modelo logístico (a) y de Luedeking-Piret (b y c).

En la figura 3.2b se muestra la evolución de la concentración de alginato durante el desarrollo del cultivo. Al igual que el crecimiento, la velocidad específica de síntesis del polímero (VESP) se incrementa en función de la TOD del medio, alcanzándose una VESP de 0.028 g algin/g biom h con una concentración máxima de 4.6 g/L al 5% de TOD. En la condición

extrema (0.5 % de TOD) sólo se produjeron 1.3 g/L de alginato con una VESP de 0.015 g algin/g biom h (tabla 3.1). La producción alginato para la diversas condiciones de oxígeno disuelto fue caracterizada mediante el modelo modificado de Luedeking-Piret (Serrano-Carreón *et al.*, 1995).

Como se muestra en la tabla 3.1, la producción de alginato a 0.5, 1 y 3% de TOD fue completamente asociada al crecimiento, con valores de α (constante asociada al crecimiento) entre 0.62 y 0.92 g algin/g biom y valores de β (constante no-asociada al crecimiento) cercanos a cero. A diferencia, al 5% de TOD, una fracción importante de alginato (20 %) se sintetizó durante la fase estacionaria de crecimiento, con un valor de β de 0.055 g algin/g biom h.

Tabla 3.1. Parámetros cinéticos de los cultivos de *Azotobacter vinelandii* desarrollados a diferentes tensiones de oxígeno disuelto a una velocidad de agitación constante de 300 rpm.

| TOD (%) | μ (h ⁻¹) | Alginato (g/L) | VESP (g/g h) | VECS (g/g h) | α (g algin/g biom) | β (g algin/g biom h) | Alginato producido durante la fase de crecimiento (% del total) |
|---------|--------------------------|----------------|--------------|--------------|---------------------------|----------------------------|---|
| 0.5 | 0.07 | 1.30 | 0.015 | 0.06 | 0.62 | 0 | 100 |
| 1.0 | 0.11 | 2.50 | 0.023 | 0.08 | 0.93 | 0 | 100 |
| 3.0 | 0.14 | 3.80 | 0.026 | 0.12 | 0.63 | 0 | 100 |
| 5.0 | 0.20 | 4.60 | 0.028 | 0.11 | 0.58 | 0.06 | 80 |
| Matraz | 0.09 | 4.00 | 0.020 | 0.071 | 0.17 | 0.02 | 50 |

Comparando estos valores con aquellos previamente obtenidos en matraces agitados (tabla 3.1), es evidente que el perfil de producción de alginato por *Azotobacter vinelandii* va a estar fuertemente influenciado por las condiciones de oxigenación del medio. Se observa que en cultivos con oxígeno controlado, el alginato es preferentemente sintetizado durante el crecimiento, mientras que en cultivos sin control de oxígeno (matraces agitados), una buena parte de la síntesis del polímero tiene lugar en la fase de no-crecimiento de la bacteria.

Los resultados obtenidos en el presente estudio coinciden con los reportados por Horan *et al* (1983). Estos autores reportan que la velocidad de síntesis de alginato es dependiente de la concentración de oxígeno del cultivo, incrementando entre 1 y 5% de TOD y disminuyendo en valores de oxígeno por arriba del 5%. Sin embargo, este es el primer reporte en la literatura en donde se estudia la influencia de la TOD sobre la producción de alginato en un cultivo en lote de *A. vinelandii*, manteniendo constante la velocidad de agitación. Otro parámetro seguido durante el cultivo fue el consumo de sacarosa. Como se observa en la figura 3.2c y la tabla 3.1, la velocidad de consumo de sacarosa (VECS) se incrementa conforme se aumenta la TOD del medio, con una velocidad máxima de consumo de azúcar de 0.12 g sac/g biom h al 3 y 5 % de oxígeno disuelto. Es importante enfatizar que aún en tiempos prolongados, la sacarosa no se consume completamente, lo cual sugiere la existencia de un factor limitante en el medio de cultivo. Como se mostrará más adelante, dicho factor pudiera ser el propio oxígeno disuelto.

En la figura 3.3 se presentan los resultados sobre el efecto de la TOD sobre la viscosidad del cultivo. La más alta viscosidad del cultivo (420 cps) se obtuvo al 5 % de TOD, mientras que a 0.5 % de TOD, la viscosidad del caldo fue de solo 8 cps. Comparada a la misma concentración de alginato (*i.e* 4 g/L), la viscosidad de los caldos de cultivo a 5 % de TOD fue de 340 cps y de sólo 16 cps al 3 % de TOD. Los datos anteriores sugieren que las características moleculares del alginato sintetizado bajo tales condiciones fueron muy diferentes. Como se mostrará más adelante, las diferencias encontradas están estrechamente relacionadas con el peso molecular de los alginatos.

Es importante señalar que, en los cultivos realizados al 5 % de TOD, la viscosidad del caldo de cultivo cae de 450 a 50 cps después de las 60 h de fermentación. Debido a que diversas especies bacterianas tales como *A. vinelandii* y *Pseudomonas* producen enzimas degradantes de alginato (Sengha et al., 1989), es probable que la disminución de la viscosidad del caldo, pudiera ser parcialmente el resultado de la degradación del alginato por la acción de alginasas liberadas al final del cultivo. Por otra parte, los datos sugieren que, a bajas tensiones de oxígeno disuelto (0.5, 1 y 3 %), la actividad de las alginasas (si estuvieran presentes) no juega un papel importante en la degradación del polímero, al menos durante las primeras 72 h de cultivo.

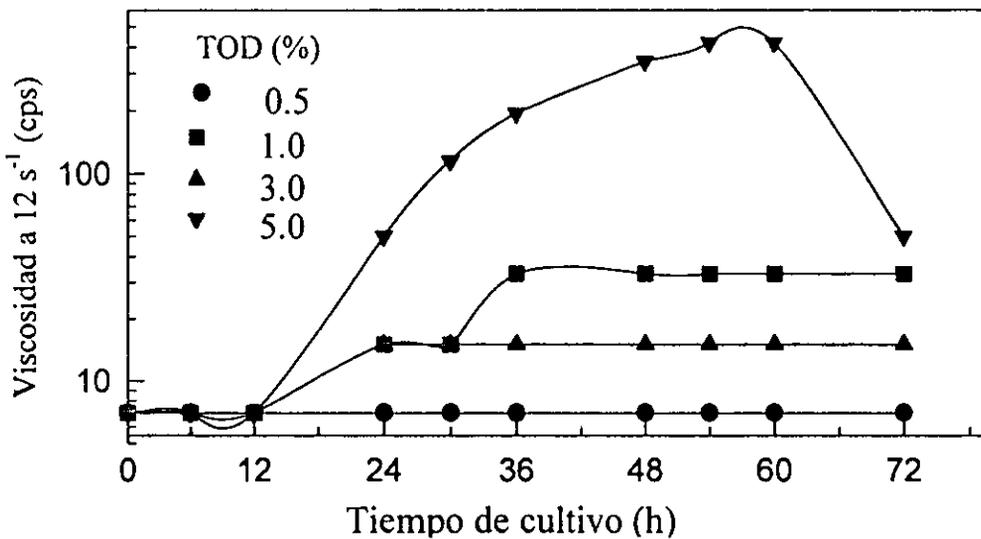


Figura 3.3. Evolución de la viscosidad de los caldos durante la producción de alginato mediante el cultivo de *Azotobacter vinelandii* a diferentes tensiones de oxígeno disuelto.

1.2.- Influencia de la velocidad de agitación a tensión de oxígeno disuelto constante.

Por otra parte, se llevaron a cabo cultivos a diferentes velocidades de agitación (300, 500 y 700 rpm) manteniendo constante la tensión de oxígeno disuelto del medio en 3 %. Como se observa en la figura 3.1b la TOD para las diferentes velocidades de agitación evaluadas se controló satisfactoriamente. De esta forma fue posible discriminar entre la influencia del

oxígeno en el seno del líquido y la velocidad de agitación, sobre la producción de alginato. En la figura 3.4(a y b) se presenta la influencia de la velocidad de agitación sobre la cinética de crecimiento de *A. vinelandii* y la producción de alginato

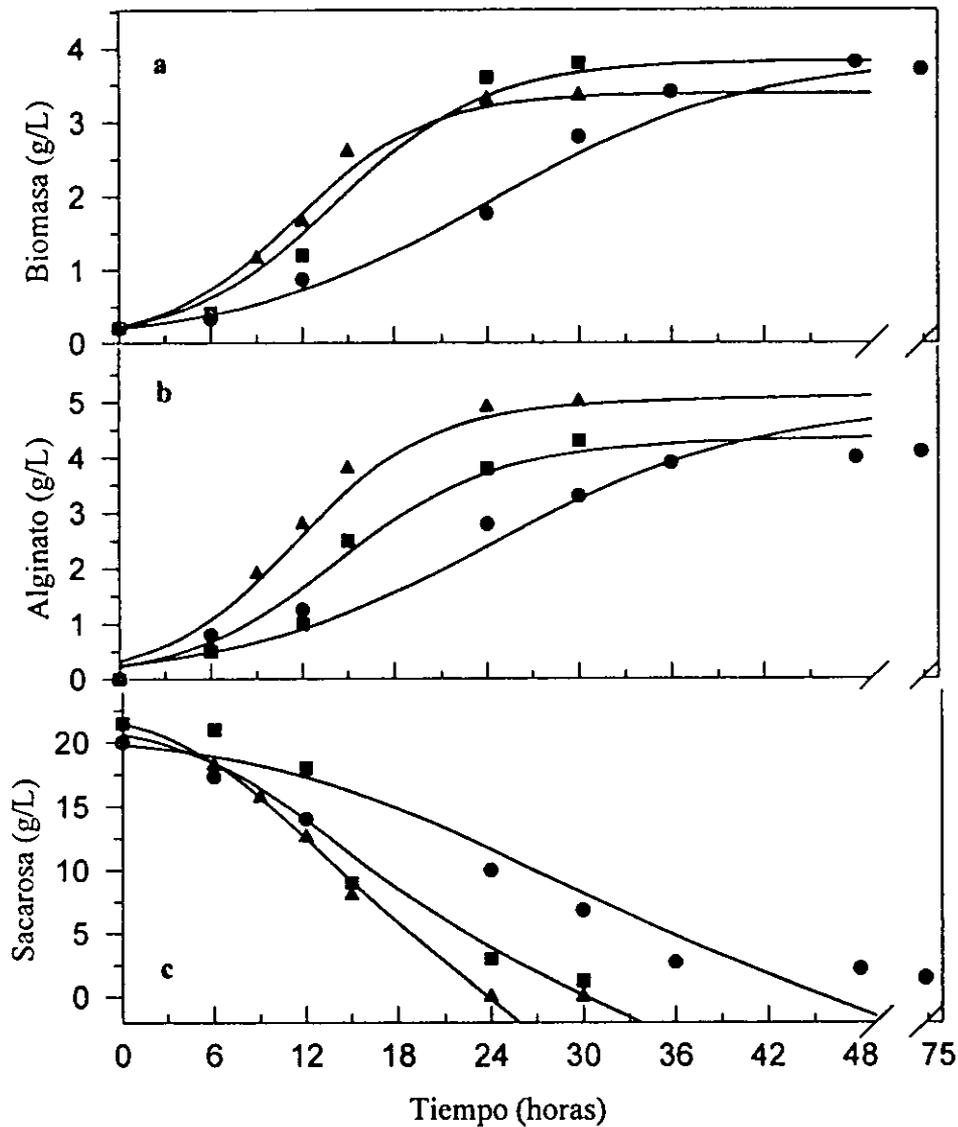


Fig 3.4. Influencia de la velocidad de agitación sobre el crecimiento celular (a), la producción de alginato (b) y el consumo de sacarosa (c), durante el cultivo de *A. vinelandii* a 300 (●), 500 (■) y 700 rpm (▲). Las líneas en los paneles a, b y c representan el ajuste del modelo logístico (a) y de Luedeking-Piret (b y c).

No obstante que la tensión de oxígeno disuelto se mantuvo constante en el seno de líquido durante la mayor parte del cultivo, la velocidad específica de crecimiento (μ) y la velocidad específica de síntesis de alginato (VESA) se incrementaron conforme la velocidad de agitación fue más alta (tabla 3.2). En los cultivos desarrollados a 700 rpm, la velocidad de crecimiento fue de 0.23 h^{-1} con una velocidad de síntesis de alginato de $0.060 \text{ g algin/g biom h}$, mientras que a 300 rpm la μ fue de 0.14 h^{-1} y la VESA de $0.026 \text{ g algin/g biom h}$ (tabla 3.2). Bajo las velocidades de agitación de 500 y 700 rpm, la sacarosa fue utilizada completamente por la bacteria con una velocidad de consumo de 0.20 y $0.25 \text{ g sac/g biom h}$ a 500 y 700 rpm respectivamente. Por otra parte, en los cultivos agitados a 300 rpm sólo el 85% de la fuente de carbono fue consumida con una VECS de $0.18 \text{ g sac/g biom h}$ (tabla 3.2). Al igual que lo observado a 300 rpm, la síntesis de alginato está completamente asociada al crecimiento tanto a 500 como a 700 rpm.

Tabla 3.2. Parámetros cinéticos de los cultivos de *Azotobacter vinelandii* desarrollados a diferentes velocidades de agitación a una tensión de oxígeno disuelto constante del 3%

| Vel. Agitac. (rpm) | μ (h^{-1}) | Alginato (g/L) | VESA (g/g h) | VECS (g/g h) | α ($\frac{\text{g algin}}{\text{g biom}}$) | β ($\frac{\text{g algin}}{\text{g biom h}}$) | Alginato producido durante la fase de crecimiento (% del total) |
|--------------------|---------------------------|----------------|--------------|--------------|---|--|---|
| 300 | 0.14 | 3.80 | 0.026 | 0.18 | 0.63 | 0 | 100 |
| 500 | 0.20 | 4.30 | 0.048 | 0.20 | 1.22 | 0 | 100 |
| 700 | 0.23 | 5.00 | 0.060 | 0.25 | 1.33 | 0 | 100 |

En la figura 3.5 se presenta la evolución de la viscosidad del caldo de los cultivos desarrollados a 300, 500 y 700 rpm. Como se observa, la viscosidad del caldo de cultivo al final de la fermentación fue mayor a 300 y 500 rpm (30 y 80 cps respectivamente), en

relación a la medida a 700 rpm (~1 cp). Como se muestra más adelante, estos valores son consistentes con el análisis de peso molecular de los alginatos aislados.

Aparentemente, además del oxígeno disuelto, las condiciones hidrodinámicas del reactor están influenciando de manera importante en la síntesis del polímero. No obstante, en este punto del trabajo no se tenían suficientes elementos para dilucidar el mecanismo de como las condiciones imperantes en el reactor incidían sobre la síntesis de alginato.

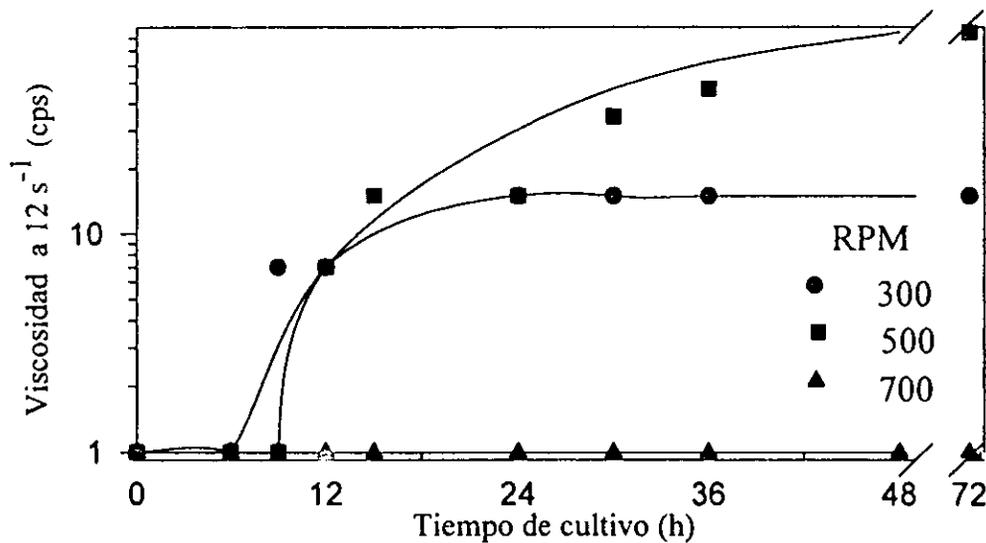


Figura 3.5. Evolución de la viscosidad de los caldos durante la producción de alginato mediante el cultivo de *Azotobacter vinelandii* a diferentes velocidades de agitación

Las primeras evidencias para explicar el fenómeno, surgieron de los estudios morfológicos de las células aisladas de los diferentes cultivos, mediante microscopía óptica. En los cultivos realizados a baja velocidad de agitación (300 rpm), la mayoría de las células fueron de tipo esférico y con un tamaño de 2.3 a 2.7 μm . Además, alrededor de las células se presentó la formación de una matriz profusa de polisacárido, la cual provoca la formación de flóculos o agregados celulares (fotografías de la figura 3.6). Esta situación pudiera estar limitando la movilidad de las células y los intercambios de nutrientes y gases con el medio; por lo tanto, la síntesis del polímero pudiera verse afectada por esta situación, probablemente

por efecto de limitación de oxígeno. Por el contrario, a 700 rpm, prácticamente todas las células fueron más pequeñas (con tamaños de 1.0 a 1.2 μm) durante el cultivo (fotografías de la figura 3.6), además de que no se presentó la formación de agregados.

Por tal razón, la mayor producción de alginato a altas velocidades de deformación (a niveles de oxígeno disuelto constante), pudiera deberse a que la velocidad de deformación, causada por la rotación del impulsor, evita la formación de microagregados y por lo tanto, se genera un ambiente más homogéneo, lo que trae como consecuencia una transferencia de masa más eficiente.



Figura. 3.6. Fotomicrografías de células de *Azotobacter vinelandii* cultivadas a 300 rpm (a) y 700 rpm (b). La barra indica 3 μm .

En la figura 3.7 se presenta la evolución del diámetro promedio de los microagregados celulares durante el cultivo de *A. vinelandii* a 300 rpm y 3% de TOD. Como se observa en la figura 3.7, el diámetro de los microagregados determinados por análisis en el contador Coulter y por microscopía óptica, se incrementa conforme el tiempo y van de 7 μm a las 24 h a 45 μm a las 48 h de cultivo. Como previamente se mencionó, la formación de dichas estructuras pudiera estar incidiendo negativamente en la biosíntesis de alginato. Evidentemente, lo deseable en términos de una mayor velocidad de síntesis de alginato, es operar a velocidades de agitación por arriba de 500 rpm para eliminar al máximo las limitaciones de transferencia de nutrientes y gases. Sin embargo, se requeriría un mayor

gasto de energía para producir la misma cantidad de producto por unidad de tiempo que a 300 rpm.

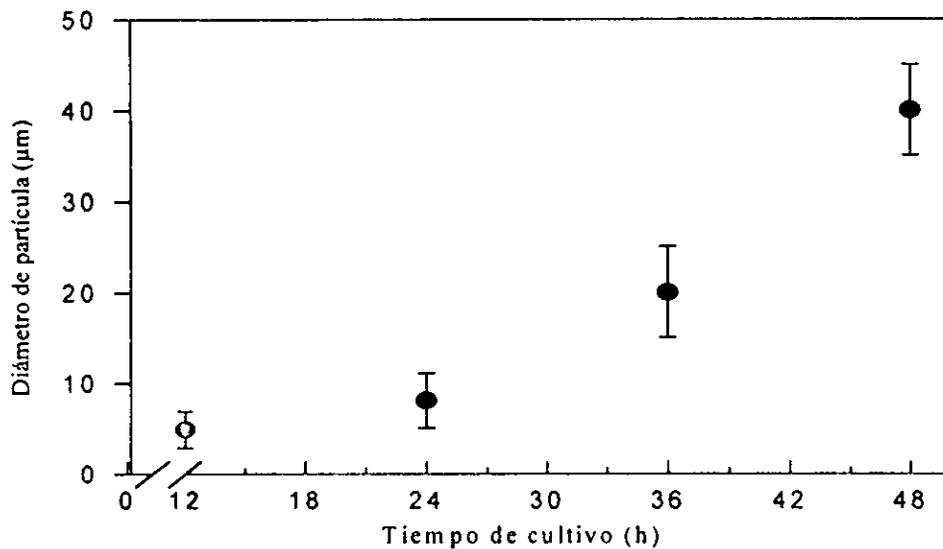


Figura 3.7. Evolución del diámetro promedio de los microagregados celulares durante el cultivo de *A. vinelandii* a 300 rpm y 3% de TOD.

Estudios realizados por otros autores (Chen *et al* 1985 y Sutherland, 1990) ha evidenciado, aunque solo en términos generales, que la velocidad de agitación puede jugar un papel importante durante la producción de alginato. Sin embargo, esta es la primera ocasión que se reporta un estudio sistemático sobre la influencia de dicha variable en la biosíntesis del alginato producido por *A. vinelandii*. En relación a la producción de otros polisacáridos microbianos, tales como el curdlano (β -1-3- glucano) producido por *Alcaligenes faecalis* y *Agrobacterium radiobacter*, Lawford y Rousseau (1991) reportan un fenómeno parecido al encontrado en el presente trabajo. Estos autores observan que, el curdlano ofrece resistencia a la transferencia de oxígeno desde el seno del cultivo a las células debido a que éste forma una capa de polímero insoluble alrededor de las células, por lo tanto, se requiere de una alta concentración de oxígeno disuelto o una alta velocidad de agitación para lograr el máximo de productividad.

Por otra parte, en el caso de la xantana producida por *Xanthomonas campestris*, Peters *et al* (1989) reportan que aún a bajas velocidades de agitación, no se afecta la productividad y la calidad del polímero siempre y cuando se garantice un adecuado suministro del oxígeno que permita el desarrollo de la bacteria en condiciones de no-limitación. Es importante señalar que, dichos autores, no observaron ninguna influencia de las condiciones hidrodinámicas sobre la producción de xantana, y a diferencia de lo observado durante la producción de alginato y curdlano, los autores no observan la formación de matriz polimérica alrededor de las células de *Xanthomonas*. Contrariamente a lo reportado para curdlano y xantana, Gibbs y Seviour (1996) afirman que la producción de pululano con *Aurobasidium pullulans* se reduce de manera significativa a altas velocidades de agitación. Estos autores explican que dicha reducción en la síntesis de pululano se debió principalmente a los altos niveles de oxígeno disuelto imperantes en el reactor, más que a un posible efecto la condición hidrodinámica.

Con el propósito de explicar el fenómeno observado en los cultivos desarrollados a bajas velocidades de agitación se propuso la siguiente hipótesis:

En condiciones de baja velocidad de agitación, se presenta la formación de una cubierta de alginato extracelular y de microagregados celulares, lo cual provoca gradientes de oxígeno disuelto hacia el interior de los mismos; lo que repercute sobre el crecimiento, la velocidad de consumo de oxígeno de la bacteria y la velocidad de síntesis de alginato.

Con el fin de evaluar las posibilidades teóricas de dicha hipótesis, se llevó a cabo en una primera aproximación, un análisis mecanístico del fenómeno, el cual se detalla en el apéndice metodológico. Es importante señalar que, para este análisis, se tomaron en cuenta las siguientes suposiciones:

- a) La velocidad de consumo de oxígeno de la bacteria, como función de la tensión de oxígeno disuelto, sigue una cinética de saturación (ver figura A.6 en el apéndice).
- b) Con base en datos de la literatura (Post *et al.*, 1982; Horan, *et al.*, 1983;), existe una correlación entre la velocidad de síntesis de alginato y la velocidad de consumo específico

de oxígeno en el rango de TOD evaluada en el presente estudio. Dicho comportamiento coincide con lo reportado para otros sistemas en los que la agitación es insuficiente (Reuss *et al.*, 1982)

c) Las células están homogéneamente distribuidas en los microagregados o elementos de fluido, los cuales se asumen esféricos.

d) El oxígeno es el único sustrato limitante durante el proceso.

e) La difusividad de oxígeno es constante en los microagregados celulares.

Con base en los datos generados y mostrados en el apéndice de cálculo, se observa una disminución importante en el factor de efectividad (en términos de la velocidad específica de consumo de oxígeno tomados de la literatura) a partir de módulos de Thiele (ϕ) superiores a 1.0. Utilizando este valor y el coeficiente de difusión de oxígeno en geles de alginato reportado por Kurosawa *et al.*, 1989), se obtuvo un valor de tamaño de partícula de 30 μm , el cual está dentro del rango de los microagregados celulares medidos experimentalmente a 300 rpm y 3% de TOD. Esta disminución en la velocidad de consumo de la bacteria, probablemente se refleje en una caída en la velocidad de síntesis del polisacárido, y como se verá más adelante en el peso molecular del alginato.

Por otra parte y basado en lo descrito por otros autores (Reuss *et al.*, 1982; See-Shown, 1989) para cultivos viscosos, es posible que en condiciones de baja agitación se presenten resistencias a la transferencia de oxígeno a nivel de elementos de fluido, determinados por la cantidad de energía suministrada al sistema en forma de agitación. De acuerdo a lo reportado por See-Shown (1989) para cultivos de *X. campestris*, la disminución en la velocidad de formación de xantana en caldos viscosos, pudiera estar relacionada a la existencia de elementos de fluido, cuyos diámetros van de 120 μm en los cultivos a alta velocidad de agitación (1000 rpm) a tamaños cercanos a las 2,000 μm en los cultivos desarrollados a baja velocidad de agitación (400 rpm). En el caso del cultivo de *Azotobacter vinelandii* para la producción de alginato, es posible que la existencia de dichos elementos provocaría una disminución extrema de la velocidad de respiración y por consecuencia de la velocidad de síntesis de alginato.

El decremento en la síntesis de alginato observada a velocidades de agitación menores a 700 rpm puede ser debido a gradientes en el oxígeno disuelto ocasionados por mezclado insuficiente. Esto, aunado a un alto valor de la velocidad de respiración del microorganismo puede conducir a gradientes considerables en el oxígeno disuelto dentro del reactor. Los datos y cálculos preliminares apuntan hacia el hecho de que, la principal resistencia a la transferencia de masa se puede estar dando a nivel de los microagregados celulares (definidos por la agitación), al menos 10 veces más grandes que el tamaño promedio de las células individuales.

1.3.- Características químicas de los diversos alginatos sintetizados bajo condiciones controladas de oxígeno disuelto y agitación.

Los diferentes productos obtenidos por fermentación fueron caracterizados fisicoquímicamente en términos del peso molecular y el grado de acetilación. En la figura 3.8 se observa como el peso molecular promedio (PMP) de los alginatos obtenidos a diferentes tensiones de oxígeno disuelto (manteniendo constante la velocidad de agitación a 300 rpm), se incrementó conforme la TOD del medio fue más alta. Analizando los polímeros aislados a las 60 h de cultivo, se aprecia que se obtienen principalmente productos de alto peso molecular en los cultivos desarrollados al 5 % de TOD. En este caso, el producto presentó un PMP de 680,000 g/g mol con un índice de polidispersión (IP) de 2.77. A diferencia, el alginato aislado de los cultivos realizados al 1 % de TOD mostró una alta proporción de fracciones de bajo peso molecular con un PMP de 266,000 g/ g mol y un IP de 1.9.

Además del peso molecular, el grado de acetilación de los alginatos analizados se incrementó al aumentar la TOD del medio, obteniéndose un máximo en el contenido de acetilos de 4.25 % (g acetilos/100 g alginato) en los productos aislados de los cultivos al 5 % de TOD (figura 3.8). No obstante que la tendencia es similar a la encontrada por otros autores (Annison y Couperwhite, 1986), los porcentajes de acetilo reportados por dichos autores son superiores (8 al 15 % de acetilación) a los encontrados en nuestro estudio.

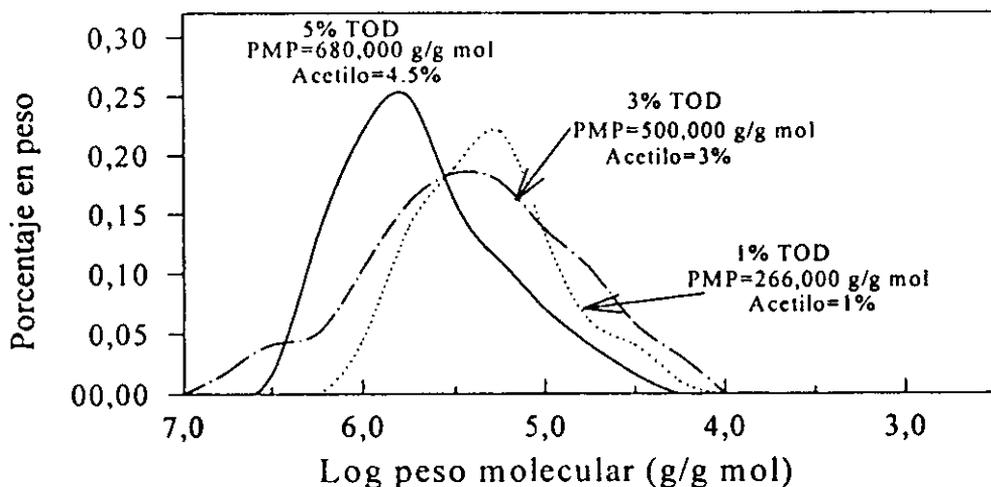


Figura 3.8. Efecto de la tensión de oxígeno disuelto (TOD) sobre el peso molecular promedio del alginato producido por *Azotobacter vinelandii*.

.Las diferencias en los valores de acetilación, pudieran deberse a diferencias en las técnicas empleadas en la medición de dichos radicales, ya que en el trabajo citado se determinó el contenido de acetilos por medio de resonancia magnética de protones (RMN- H^1) y en nuestro estudio el análisis se llevó a cabo usando el método espectrofotométrico reportado por Mc Comb y Mc Cready (1957). Por otro lado, estudios recientes realizados por Cárdenas (1997), sobre la composición fina del alginato sintetizado por *A. vinelandii*, revelan porcentajes de acetilación del 13% para el alginato aislado de matraces bafleados (72 h) y del 30%, para el polímero proveniente de matraces no-bafleados. En este caso, las muestras se analizaron por medio de RMN- H^1 y los valores coinciden con los reportados previamente.

En la figura 3.9 se presenta la evolución de los pesos moleculares de los alginatos obtenidos bajo diferentes condiciones de agitación. Por un lado, el peso molecular de los alginatos obtenidos de los cultivos llevados a cabo a 500 rpm se mantiene constante durante toda la fermentación, con valores por arriba de 1,000,000 g/g mol. A diferencia, el peso molecular promedio del polímero producido a una velocidad de agitación de 700 rpm, disminuye drásticamente conforme avanza el cultivo, obteniéndose (a las 24 h) un producto con un peso

molecular promedio de 352,000 g /g mol y este disminuye hasta 47,000 g /g mol al final de la fermentación (36 h).

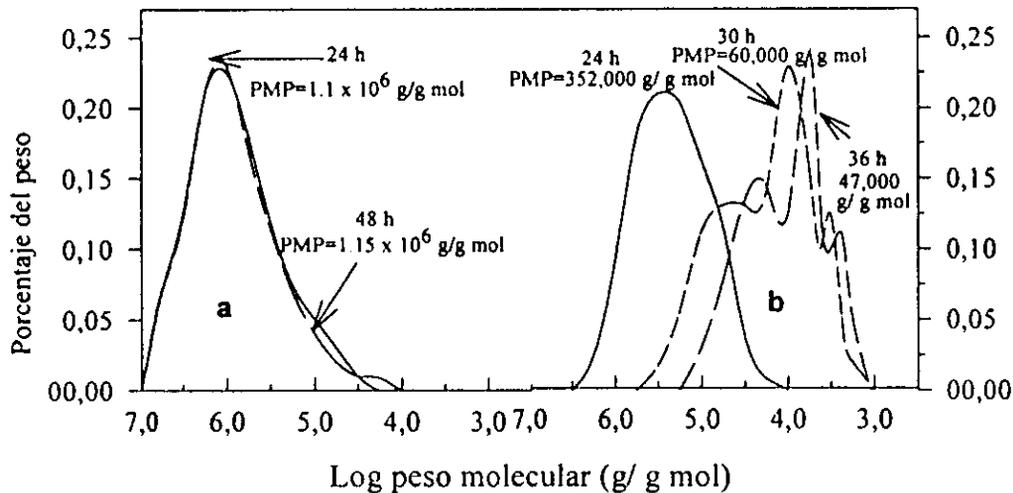


Figura 3.9. Evolución de pesos moleculares del alginato aislado del cultivo de *A. vinelandii* a diferentes velocidades de agitación y una TOD constante del 3%: 500 rpm (a); 700 rpm (b).

Los resultados anteriores sugieren una fuerte influencia de la TOD sobre el peso molecular promedio de los alginatos obtenidos por fermentación. Bajo condiciones en donde se pudieran encontrar gradientes de oxígeno, como aquellas posiblemente presentes a 1, 3 y 5 % (300 rpm) y 500 rpm (3 %), el peso molecular del alginato sintetizado por la bacteria se incrementa conforme la TOD aumenta hasta un máximo de 1.1×10^6 g/ g mol, mientras que a altas tensiones de oxígeno 3 % (700 rpm), el microorganismo produce un polímero de bajo peso molecular (figura 3.7). Este comportamiento puede ser explicado por el hecho de que en los cultivos desarrollados a 300 rpm se presentó la formación de agregados en cualquiera de las condiciones de oxígeno evaluadas. Así, aunque la tensión de oxígeno disuelto en el seno del líquido se controló a 1, 3 y 5 % de saturación (en la primera parte del estudio), la concentración de oxígeno que realmente verían las células hacia el interior de los agregados sería mucho menor.

Es probable que la disminución en el peso molecular del alginato que se produce a alta velocidad de agitación se pudiera deber a la sensibilidad del polímero al esfuerzo de corte. Sin embargo, experimentos realizados posteriormente, han demostrado que aún después de 24 h de exposición a 700 rpm, el peso molecular del polímero se mantiene constante. Por otra parte, cuando se incubaba el alginato de alto peso molecular (aislado de matraces convencionales) durante 12 h con un caldo de fermentación (separado de los cultivos a 700 rpm a las 36 h), hay una disminución importante en el peso molecular del alginato (de 287,000 g/mol inicial a 62,200 g/mol). Estos resultados nos llevan a proponer la posible presencia de actividad de alginasa en el caldo de fermentación, la cual pudiera ser responsable de la degradación del polímero.

En principio, se considero que la liberación de enzimas con actividad alginasa pudiera ser resultado de posible daño mecánico de la envoltura celular por la acción de la agitación. Sin embargo, dicha hipótesis es poco probable, ya que las paredes celulares de bacterias de tipo Gram-negativo tales como *A. vinelandii* exhiben una alta resistencia a la ruptura mecánica por agitación (Edebo, 1969). Por lo tanto, es poco probable que las células de *A. vinelandii* pudieran verse dañadas a altas velocidades de agitación en cultivos prolongados y de esta manera liberar enzimas periplásmicas. Una posibilidad es que las alginasas pudieran ser liberadas al medio extracelular en un mecanismo controlado por el nivel de oxígeno del medio. Sin embargo, esta hipótesis estaría sujeta a demostrarse.

La caída del peso molecular a alta velocidad de agitación (y mejores condiciones de transferencia de oxígeno), coinciden con los resultados obtenidos a nivel de matraz. En este caso se encontró que se obtiene un polímero de bajo peso molecular en los cultivos desarrollados en matraces bafleados (alta aireación/agitación); mientras que, el alginato sintetizado en matraces no-bafleados (baja aireación/agitación) presentó fracciones de alto peso molecular.

Los datos del presente estudio sugieren fuertemente que la síntesis y/o expresión de la liasa de alginato parece estar controlada por los niveles de oxígeno del caldo de cultivo, en un mecanismo posiblemente similar al observado por Horan *et al.*, (1983) para las actividades de

otras enzimas involucradas en la biosíntesis de alginato (fosfomanosa isomerasa y GDP manosa pirofosforilasa) por *Azotobacter vinelandii*.

Mientras que la selectividad para el enlace de cationes y las propiedades de formación de gel dependen fuertemente del contenido relativo y la distribución de los dos monómeros (manurónico y gulurónico), la viscosidad de las soluciones y, por consecuencia, su capacidad espesante, está principalmente relacionada con el peso molecular del alginato. Se ha encontrado que las características de difusión, porosidad y homogeneidad, como también la estabilidad química y mecánica de geles de alginatos usados en alimentos y otras industrias, depende de la composición química y el peso molecular de los productos (Martinsen *et al.*, 1991; Draget *et al.*, 1994). Sin embargo, al igual que otras preparaciones de polisacáridos, la población de moléculas de alginato puede mostrar una considerable heterogeneidad en cuanto a su composición y a su peso molecular. Por tal razón, la síntesis de alginatos a través del control fino de las condiciones de cultivo de *Azotobacter vinelandii* ofrece la posibilidad de obtener alginatos de composición y talla molecular definida, de gran importancia en el mercado de hidrocoloides usados en alimentos.

1.4 CONCLUSIONES

Los resultados del presente estudio han demostrado como la concentración de oxígeno disuelto y la velocidad de agitación juegan un papel importante en la síntesis de alginato y su composición. La máxima velocidad de producción específica de alginato fue de 0.06 g algin/g biom h y se obtuvo al 3% de TOD en conexión con una alta velocidad de agitación (700 rpm). En los cultivos desarrollados a 300 rpm, se observó la formación de una matriz de exopolisacárido alrededor de las células y la formación de microagregados celulares. Es posible que a nivel de dichas agrupaciones celulares o a una escala mucho mayor (elementos de fluido), se presenten resistencias a la transferencia de oxígeno, las cuales repercutan en el crecimiento de la bacteria, la síntesis de alginato y la composición del mismo. Al igual que la producción de alginato, el peso molecular promedio y el grado de acetilación son afectados por la TOD del medio. A baja velocidad de agitación (300 rpm), el peso molecular promedio (PMP) y el grado de acetilación se incrementa al aumentar la

TOD del medio de 1 a 5% de saturación. Mientras que a 700 rpm el PMP del alginato disminuye sensiblemente. Lo anterior parece estar relacionado con la síntesis de alginasas al final del cultivo. Finalmente, los resultados han demostrado como a través del control cuidadoso de las condiciones de fermentación (tales como la TOD y la velocidad de agitación) es posible producir alginatos con propiedades físicas particulares, que puedan ser utilizados para aplicaciones específicas.

CAPITULO 4

I.DISCUSION GENERAL

No obstante los diversos estudios reportados en la literatura en relación a la influencia de las condiciones de cultivo sobre la producción de alginato usando cepas de *Azotobacter vinelandii*, existe poca información (según se muestra en los antecedentes) concerniente al efecto del oxígeno disuelto sobre la producción y las características fisicoquímicas del polímero sintetizado por la bacteria. Debido a lo anterior, una de las preguntas centrales planteadas en el presente estudio fue ¿de que forma el oxígeno y la velocidad de agitación afectaban la producción y composición del alginato sintetizado por *A. vinelandii*?. Las primeras respuestas a dicha interrogante se generaron durante el estudio realizado en matraces agitados ("Changes in alginate molecular mass distributions, broth viscosity and morphology of *Azotobacter vinelandii* cultured in shake flasks", *Applied Microbiology and Biotechnology* Vol 48:510-515, 1997).

Los primeros resultados obtenidos en matraces agitados, evidenciaron como, en condiciones de alta aireación/agitación, el microorganismo desvía la fuente de carbono preferentemente para la producción de biomasa, en detrimento de la síntesis de alginato. En contraste, en condiciones de baja aireación/agitación, la bacteria sintetiza una mayor cantidad de alginato. Sin embargo, con dicha información no era posible discriminar entre la influencia de la tensión de oxígeno disuelto (TOD) y las condiciones hidrodinámicas imperantes en el reactor. Por tal razón, se planearon estudios a nivel de fermentador, en condiciones estrictamente controladas de oxígeno disuelto y velocidad de agitación y de esta manera poder analizar el efecto independiente de cada una de estas variables sobre la producción del polímero (información presentada en el tercer capítulo de la tesis).

Los resultados mostraron como, tanto la velocidad de crecimiento del microorganismo como la velocidad de síntesis de alginato se incrementan al aumentar la TOD del medio en el rango de 0.5 a 5% de saturación (a una velocidad de agitación constante de 300 rpm). En principio, esta información parece contradictoria con lo observado previamente a nivel de matraz; sin

embargo, es posible que la tensión de oxígeno disuelto imperante en los matraces bafleados esté por arriba del valor máximo (5%) controlado a nivel de fermentador y por tal razón el microorganismo desvíe la fuente de carbono para el crecimiento celular. Por el contrario, en los matraces no-bafleados la tensión de oxígeno pudiera variar entre 5 y 0 % de saturación.

La hipótesis anterior, se apoya en la información existente sobre las condiciones de transferencia de oxígeno en matraces convencionales y matraces bafleados. Estudios realizados por van Suidjam (1978) revelan que con el uso de matraces bafleados se obtienen coeficientes de transferencia de masa ($k_L a$) mayores con respecto a los obtenidos en matraces no-bafleados. En este estudio se reporta un $k_L a$ de 36 h^{-1} en matraces no-bafleados de 500 mL con 100 mL de medio sintético agitado a 220 rpm y de 482.4 h^{-1} calculado en matraces bafleados bajo las mismas condiciones. Por otra parte, si se comparan estos valores con los obtenidos en nuestro estudio (26 h^{-1} a 300 rpm y 1.0 VVM) para fermentador con medio complejo, se observaría como, en términos de la transferencia de oxígeno, las condiciones de aireación del fermentador son más parecidas a las que prevalecen en los matraces no-bafleados.

En cuanto al efecto de la velocidad de agitación, los resultados indican que no obstante que la tensión de oxígeno disuelto se mantuvo constante en el seno de líquido durante la mayor parte del cultivo, la velocidad específica de crecimiento (μ) y la velocidad de síntesis del polímero (VSP) se incrementaron al aumentar la velocidad de agitación en el rango de 300 a 700 rpm. Aparentemente, además del oxígeno disuelto, las condiciones hidrodinámicas del reactor influyen de manera importante sobre la síntesis del polímero. Sin embargo, en este punto del trabajo no se tenían suficientes elementos para dilucidar el mecanismo de como las condiciones imperantes en el reactor incidían sobre la síntesis de alginato.

Las primeras evidencias para explicar el fenómeno, surgieron de los estudios morfológicos de las células aisladas de los diferentes cultivos mediante microscopía óptica y con la ayuda del contador de partículas Coulter. En los cultivos realizados a baja velocidad de agitación (300 rpm) y también en matraces no bafleados, las células tienden a formar microagregados, mientras que las células cultivadas a 700 rpm y en matraces bafleados, no

formaban este tipo de estructuras. Con base en esta información, se planteó la hipótesis de que la formación de agregados pudiera generar gradientes de nutrientes y estar limitando la movilidad de las células y los intercambios de nutrientes y gases con el medio; por lo tanto, la síntesis del polímero pudiera verse afectada por esta situación, probablemente por efecto de la limitación de nutrientes.

Al mismo tiempo, los resultados de la cinética de fermentación en matraces no bafleados y en fermentador (a 300 rpm), mostraron la presencia de azúcar residual al final del cultivo; lo que apoyó la idea de que el factor limitante durante la fermentación era el oxígeno disuelto más que la fuente de carbono. Estudios posteriores, relacionados con el efecto de la tensión de oxígeno disuelto sobre la velocidad de síntesis de alginato (ya sea volumétrica o específica) a 300 y 500 rpm, confirmaron dicha hipótesis.

Para el cultivo de microorganismos filamentosos (Reuss *et al.*, 1982) y durante la producción de xantana con *Xanthomonas campestris* (See-Shown, 1989) se ha observado una curva típica de saturación al graficar la velocidad específica de consumo de oxígeno como una función de la TOD y la velocidad de agitación (este último parámetro determina la magnitud de los agregados o elementos de fluido); en la cual la constante de saturación aparente (K_m) es más baja al aumentar la velocidad de agitación, y por otro lado, la velocidad específica de consumo de oxígeno no alcanza su valor máximo aún a 100% de saturación cuando se utilizan bajas velocidades de agitación. Este comportamiento general se encontró para *A. vinelandii* al graficar la velocidad específica de síntesis de alginato como una función del oxígeno disuelto para diferentes velocidades de agitación.

En un primer intento de explicar el fenómeno, se llevó a cabo un análisis cinético-difusional, el cual demostró que en condiciones de baja velocidad de agitación (300 rpm), las principales resistencias a la transferencia de oxígeno, pudieran estar ocurriendo a nivel de los microagregados celulares, de tal forma que la transferencia de oxígeno desde el seno del cultivo, a través de la frontera del microagregado hacia cada célula, pudiera ser el factor limitante del proceso.

Sin embargo, para esclarecer con detalle el mecanismo del fenómeno, se recomienda la realización de estudios que incluyan el seguimiento de la velocidad de respiración de la bacteria y una evaluación más rigurosa de la evolución de la distribución del tamaño de los microagregados durante el cultivo.

Sin duda, una de las aportaciones más importantes del presente estudio fue el haber demostrado la influencia del oxígeno disuelto sobre la distribución de pesos moleculares y el grado de acetilación del alginato. Como se menciona en este trabajo, la viscosidad y el peso molecular del alginato sintetizado por *A. vinelandii* es altamente dependiente de las condiciones de aireación del cultivo. A baja velocidad de agitación (300 rpm) a TOD del 1, 3 y 5 %, el peso molecular del alginato sintetizado por la bacteria se incrementa conforme la TOD aumenta, mientras que a altas tensiones de oxígeno 3 % (700 rpm) y matraces bafleados, el microorganismo produce un polímero de bajo peso molecular. Así también, se muestra como, en los matraces agitados, el peso molecular del alginato se incrementa con la edad del cultivo.

Estos resultados difieren de los reportados por Leitao and Sa- Correia (1993) para la síntesis de alginato por *Pseudomonas aeruginosa*. Dichos autores encuentran que el peso molecular del alginato sintetizado por esta bacteria se incrementa a altos niveles de oxígeno disuelto en el rango de 5 a 70% de TOD. Las diferencias observadas en ambos estudios, pudieran estar relacionadas con diferencias en la sensibilidad de las enzimas polimerizantes (o despolimerizantes?) a los niveles de oxígeno del medio entre *Azotobacter* y *Pseudomonas*.

Los resultados descritos apoyan la hipótesis de que la disminución en el peso molecular del alginato que se produce a alta velocidad de agitación se pudiera deber a la presencia de actividad depolimerizante (alginasas) en el caldo de fermentación, la cual pudiera ser responsable de la degradación del polímero. Además, experimentos realizados en nuestro grupo han demostrado que el peso molecular del polímero se mantiene constante por períodos prolongados de tiempo a una alta velocidad de agitación.

En principio, se consideró que la liberación de enzimas con actividad alginasa pudiera ser el resultado del posible daño mecánico de la envoltura celular por la acción de la agitación. Sin

embargo, dicha hipótesis es poco probable ya que, pruebas de viabilidad celular, demostraron que aún en tiempos finales del cultivo, la viabilidad se mantiene. Por lo tanto, es poco probable que las células de *A. vinelandii* pudieran verse dañadas a altas velocidades de agitación en cultivos prolongados y de esta manera liberar enzimas periplásmicas.

Los datos del presente estudio sugieren fuertemente que la síntesis y/o expresión de las enzimas involucradas en la polimerización (polimerasas) y despolimerización (alginasas) del alginato parecen estar controladas por los niveles de oxígeno del caldo de cultivo, en un mecanismo posiblemente similar al observado por Horan *et al.*, (1983) para las actividades de otras enzimas involucradas en la biosíntesis de alginato (fosfomanosa-isomerasa y GDP manosa-pirofosforilasa) por *Azotobacter vinelandii*.

Los estudios preliminares demuestran, cierta influencia de la TOD sobre el grado de acetilación de la molécula. Si bien, los valores absolutos difieren de los reportados por otros autores (Annison y Couperwhite, 1986), la tendencia es parecida. En ambos trabajos se observa un incremento en el contenido de acetilos al aumentar la aireación del cultivo. No obstante, en el trabajo referido, no se aclara si el efecto es debido a los cambios en las condiciones hidrodinámicas del reactor o al efecto *per se* de la tensión de oxígeno disuelto, ya que el control de esta variable se realizó a través de la manipulación del flujo de gases.

Finalmente, el estudio aporta información relevante en relación a la influencia de las condiciones de aireación sobre la morfología de *A. vinelandii* y la síntesis de PHB. Los resultados demuestran que la morfología del microorganismo cambia en respuesta a las diferentes perfiles de oxígeno que se espera en los cultivos. En condiciones de baja aireación, las células incrementan su tamaño durante el cultivo, mientras que en condiciones de alta aireación, las células disminuyen de tamaño. El aumento en el tamaño celular está estrechamente relacionado con la acumulación de PHB intracelular y de alginato extracelular, mientras que la reducción en el tamaño de las células puede ser parcialmente explicada por la degradación del PHB, el cual es utilizado como fuente energética en el punto de agotamiento de la fuente original de carbono, en este caso la sacarosa. Como se señala en el artículo, es posible que en matraces no-bafleados (alta aireación) el oxígeno pudiera ser el factor limitante

en el crecimiento de la bacteria después de las 36 h de cultivo. Lo anterior se basa en el hecho de que en matraces no-bafleados, aún después de las 72 h el azúcar residual es 30% del inicial, mientras que en matraces bafleados la sacarosa se consume completamente (datos no mostrados en el artículo).

II. CONCLUSIONES GENERALES

1) Los resultados del presente estudio demuestran como, el oxígeno disuelto y la posible existencia de gradientes de oxígeno, influyen de manera importante sobre el crecimiento y morfología de *Azotobacter vinelandii*, la producción de alginato y de polihidroxitirato (PHB) y sobre las características químicas y reológicas de los diversos productos obtenidos por fermentación.

2) Los estudios a nivel de matraz demostraron que, en condiciones de baja aireación/agitación (matraces convencionales), se produce una mayor cantidad de alginato con un producto alto peso molecular y, por consecuencia, de mejor calidad reológica.

3) Los resultados revelaron que la morfología y las formas de agrupación de la bacteria cambian en respuesta a los diferentes perfiles de oxígeno de los cultivos, observándose la formación de microagregados bajo condiciones de agitación insuficiente. Dichos cambios están asociados a la producción de PHB y de alginato.

4) Mediante el sistema de control de gases usado en el presente estudio fue posible discriminar entre la influencia del oxígeno y de las condiciones hidrodinámicas imperantes en el fermentador.

5) Bajo condiciones controladas de oxígeno, la mayor producción de alginato (5 g/L) y la mayor velocidad de síntesis del polímero (0.06 g algin/g h) se alcanzó al 3% de TOD en asociación con una alta velocidad de agitación. Por otra parte, a baja velocidad de agitación (300 rpm), se observó la formación de microagregados celulares, los cuales pueden alcanzar un tamaño cercano a las 40 μm .

6) El estudio cinético difusional, apoya la idea de que, las principales resistencias a la transferencia de oxígeno pudieran estar ocurriendo a nivel de los microagregados celulares. Dicha situación, pudiera limitar el transporte de nutrientes y productos desde el seno del

cultivo a través de la frontera del agregado hacia cada célula y como consecuencia, influir en el crecimiento de la bacteria y la producción de polímero.

7) En condiciones de oxígeno disuelto y velocidad de agitación controladas, se encontró que el oxígeno disuelto determina de manera importante el peso molecular del producto y el grado de acetilación de la molécula, observándose un aumento en el peso molecular y el grado de acetilación del alginato a bajas velocidades de agitación (en condiciones donde ocurrirían gradientes de oxígeno). Mientras que, a 700 rpm (en condiciones de homogeneidad de la concentración de oxígeno) se produce un alginato de baja talla molecular.

8) La disminución del peso molecular del alginato en los cultivos desarrollados a alta velocidad de agitación, podría derivarse de la acción de enzimas con actividad depolimerizante (alginasas), las cuales tiendan a degradar el polímero ya sintetizado. La síntesis y/o actividad de dichas enzimas pudiera estar regulada por los gradientes de oxígeno disuelto del cultivo, lo cuales están determinados a su vez por las condiciones de agitación del biorreactor.

9) Finalmente, es importante señalar que a través del cultivo de *A. vinelandii* es posible producir alginatos con una gran diversidad de estructuras (en términos de su peso molecular y grado de acetilación). Debido a esto, es posible, a través del control cuidadoso de las condiciones físicas de cultivo, tales como el oxígeno disuelto, diseñar alginatos con propiedades físicas particulares, los cuales pudieran ser usados en aplicaciones específicas en la industria farmacéutica y de alimentos.

III. RECOMENDACIONES

Con base en los resultados obtenidos, para trabajos futuros se recomienda lo siguiente:

1) La velocidad de agitación del reactor determina gradientes de oxígeno disuelto en el interior de los cultivos, los cuales afectan la síntesis y composición del alginato, así como la morfología del microorganismo. Por tal razón, en experimentos posteriores se sugiere evaluar el efecto del oxígeno disuelto eliminando las posibles barreras difusionales, a través del uso de una alta velocidad de agitación (*ie* 700 rpm).

2) Con el propósito de incrementar la velocidad de síntesis del polímero, se recomienda probar tensiones de oxígeno disuelto (reales) arriba del 3% de saturación, ya sea a partir del aumento en la presión parcial en el seno del cultivo o a través del incremento de la velocidad de agitación.

3) En el presente trabajo se observó la degradación de alginato a altas velocidades de agitación o en tiempos finales de cultivo, posiblemente debido a la acción de alginasas. Se recomienda la realización de más estudios tendientes a verificar la presencia de dicha enzima o complejo enzimático y dilucidar la relación entre el oxígeno disuelto y la forma en que está regulada la expresión de dicha enzima.

4) Un problema encontrado durante el cultivo de *A. vinelandii* fue la dificultad de controlar la tensión de oxígeno disuelto por arriba del 5%, debido a la alta velocidad de consumo de oxígeno que exhibe el microorganismo y las limitaciones de transferencia de gases que ofrece el sistema utilizado. Por tal razón, se sugiere mejorar la capacidad de transferencia de oxígeno del reactor, a través de la incorporación de un sistema difusor de gas más eficiente (que genere un tamaño de burbuja más pequeño) y de esta manera poder alcanzar coeficientes de transferencia de masa ($k_L a$) más altos que permitan estudiar la influencia del oxígeno en niveles superiores a los hasta ahora evaluados.

5) Se encontró que, las caídas en la velocidad de síntesis de alginato pudieran ser explicadas por la existencia de agregados celulares en el cultivo. Sin embargo, se sugiere la realización de estudios posteriores sobre la velocidad de respiración del microorganismo en condiciones controladas de oxígeno disuelto y agitación, para apoyar experimentalmente dicha hipótesis.

6) En los análisis químicos realizados a los diversos alginatos obtenidos por fermentación, se consideró exclusivamente el peso molecular del alginato, así como su grado de acetilación. Es importante la realización de estudios complementarios que consideren el efecto de las condiciones de cultivo (particularmente el oxígeno disuelto) sobre la organización de la molécula en términos de la distribución de ácido manurónico y gulurónico y la relación que esto tiene con las propiedades funcionales de los diferentes polisacáridos.

7) Se propone para estudios posteriores, la utilización de cepas mutantes como la cepa AT268y la doble mutante (ambas generadas en el Grupo de la Dra. Guadalupe Espin), las cuales presentan mutaciones en los genes involucrados en la síntesis de PHB. Durante el cultivo de dichas cepas a nivel de matraz y fermentador de dos litros se ha observado la síntesis de un alginato de alto peso molecular, el cual se mantiene constante al final del cultivo, a diferencia del alginato sintetizado por la cepa silvestre mucoide ATCC-9046.

8) Por otra parte, se plantea el estudio del cultivo a nivel de fermentador de cepas de *A. vinelandii* mutadas en el gen AlgF (el cual codifica para la expresión de la acetilasa), con el propósito de obtener un polímero deacetilado similar al alginato comercial que se obtiene de las algas marinas.

9) Debido a que a nivel de matraz y en fermentador (a bajas velocidades de agitación) se observó la presencia de agregados celulares y por lo tanto de gradientes de concentración de oxígeno, los cuales a su vez pueden incidir sobre la síntesis del alginato, se propone estudiar de manera sistemática el efecto de condiciones oscilantes de la tensión de oxígeno disuelto sobre la producción y calidad del alginato.

10) Durante el escalamiento del proceso de producción de alginato de matraz a fermentador se observó un aumento en la productividad de alginato; sin embargo, el peso molecular del alginato disminuyó significativamente. Estas diferencias parecen estar relacionadas con la velocidad de respiración del microorganismo y, por consecuencia, con la concentración de bióxido de carbono del caldo de cultivo. Por tal razón, se propone en trabajos posteriores estudiar la influencia del CO_2 sobre el crecimiento de la bacteria y la producción y composición del polímero.

APENDICES

I APENDICE METODOLOGICO

L1 Medio de cultivo y condiciones de crecimiento

El microorganismo se creció en medio Burk modificado el cual presentó la siguiente composición en g/L: sacarosa (20); extracto de levadura (3); K_2HPO_4 (0.66); KH_2PO_4 (0.16); MOPS (1.42); $CaSO_4$ (0.05); NaCl (0.2); $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.2); $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ (0.0029); $FeSO_4$ (0.027). Las sales de potasio, la sacarosa, el extracto de levadura y el MOPS se disolvieron en 900 mL de agua destilada y se ajustó el pH a 7.2 con NaOH (2N). A su vez, el sulfato de calcio se disolvió en 50 mL y las sales restantes en el mismo volumen de agua destilada. Con el objeto de evitar precipitaciones, las tres fracciones se esterilizaron por separado a 121°C durante 15 min y ya estériles se mezclaron en la campana de flujo laminar.

Los cultivos a nivel de matraz se llevaron a cabo en matraces no bafleados (Erlenmeyer convencionales) y bafleados (con tres baffles laterales) conteniendo 100 mL de medio líquido Burk, a 200 rpm y 29°C, durante 72 h. Por otra parte, se realizaron cultivos en un fermentador de 1.5 L (Virtis) equipado con tres turbinas Rusthon (diámetro impulsor/diámetro del tanque=0.5) con un volumen inicial de 1.0 l. El pH fue controlado a 7.2 mediante la adición automática de NaOH (2 N). La tensión de oxígeno disuelto (TOD) se midió mediante un electrodo polarográfico de oxígeno (Ingold), y su señal fue amplificada y adquirida por una computadora Macintosh II SI vía una interface Mac Adios II A/D & D/A (GW Instruments). La TOD fue controlada en línea usando un programa escrito en Microsoft Quickbasic. La TOD se controló entre 0.5 y 5 % con respecto a la saturación del aire, mediante la manipulación de la presión parcial de nitrógeno y oxígeno en la alimentación, a través controladores de flujo másico (Brooks Instruments) y usando un algoritmo de control proporcional. Las fermentaciones se corrieron a un flujo de gas constante de 800 ccpm, 29°C, y una velocidad de agitación de 300, 500 y 700 rpm. Con el sistema descrito se pudo controlar muy satisfactoriamente la TOD en valores cercanos al *set point*. Cada seis horas se tomaron muestras de 20 mL para las determinaciones analíticas.

1.2 Determinación del crecimiento microbiano por turbidimetría

a) Se tomó una alícuota de 1.0 mL del caldo de fermentación y se diluyó 1/50 con agua destilada. Posteriormente, se leyó la absorbancia de la muestra a 540 nm en un espectrofotómetro Beckman modelo DU 650 y los valores se extrapolaron en una curva de peso seco, la cual se construyó de la siguiente manera:

a) Se cultivó el microorganismo durante 48 h en matraces Erlenmeyer en condiciones estándar de cultivo (29°C, pH 7.2 y 200 rpm).

b) Cada 6 h se tomaron alícuotas de 10 mL, se mezclaron con 1.0 ml de EDTA (0.1M) y un mL de cloruro de sodio (1 M) y se centrifugaron (Centrifuga Beckman modelo) a 12,000 rpm durante 20 min.

c) Después de centrifugar, se separó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en 10 mL de solución isotónica y se lavó en dos ocasiones.

d) Se tomaron 3 mL de la resuspensión y se filtraron en membrana Millipore con un tamaño de poro de 0.22 µm previamente secadas a 70°C por 24 h.

e) Las membranas se secaron a 70°C durante 24 h, para finalmente pesarse y obtener por diferencia de peso la cantidad de biomasa (peso seco).

f) Al mismo tiempo de cada muestra, se tomó una alícuota de 1.0 mL del caldo de fermentación, se diluyó 1/50 con agua destilada y se midió absorbancia a 540 nm en el espectrofotómetro.

g) Los resultados fueron graficados y se estableció la relación entre absorbancia y su correspondiente peso seco, obteniéndose la curva presentada en la figura A.1.

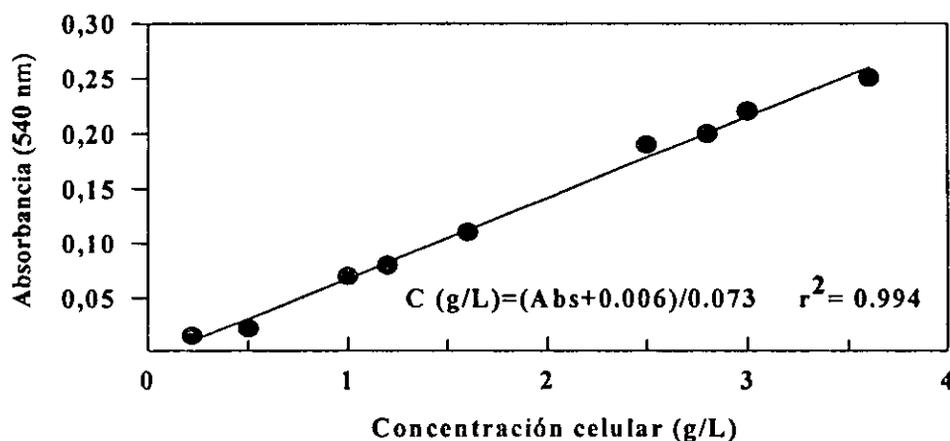


Figura A.1. Curva patrón para la determinación de la concentración de biomasa

1.3 Determinación del crecimiento microbiano por conteo directo en el contador Coulter

Se tomaron muestras de 20 μL del caldo de fermentación y se realizaron diluciones de 1/1000 (para las muestras de las 6 a las 24 h) y de 1/4000 (para las muestras de las 30 a las 72 h) en solución isotónica (0.1 M) constituida con cloruro de sodio, cloruro de potasio y fosfato monosódico. Posteriormente, las muestras fueron analizadas en un contador de partículas Coulter modelo Multisizer II, haciendo pasar un volumen de 100 μL a través de un tubo con una apertura de 50 μm . El número y tamaño de las células fueron determinados utilizando el programa Multisizer II (*software* ofrecido por el fabricante).

1.4 Determinación de sacarosa por el método de β -fructofuranosidasa-DNS

Este método se basa en la hidrólisis de la sacarosa usando una invertasa y la posterior medición de los azúcares reductores libres por la reducción del ácido dinitrosalicílico (DNS), formando un compuesto nitroaminado colorido (amarillo), cuya densidad óptica es proporcional a la concentración de grupos reductores (Miller, 1959).

Preparación de soluciones:

Solución de DNS: Pesar 16 g de hidróxido de sodio, 300 g de tartrato de sodio y 10 g de DNS y mezclar en este orden en 1.0 L de agua destilada, calentando para una disolución total.

Solución enzimática: Mezclar 2.5 mg de la enzima β -fructofuranosidasa (Gist-Brocades con una actividad de 243 U/mg a 40°C) con 1 mL de amortiguador de citratos (0.32 M, pH 4.6).

Procedimiento

Se tomó una alícuota de 1.0 mL del caldo de fermentación y se diluyó 1/25 con agua destilada. De aquí, se sirvieron 0.9 mL en tubos de ensayo y se mezclaron con 0.1 mL de la solución enzimática. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 3 minutos y posteriormente se adicionaron 3 mL de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico, Sigma Chemical Co.). Los tubos se calentaron a ebullición durante 5 min e inmediatamente después se enfriaron en baño de hielo. A cada tubo se les adicionaron 10 mL de agua destilada y se leyó la absorbancia a 540 nm contra un blanco de reactivos. Los valores se extrapolaron en la curva patrón, la cual se elaboró utilizando soluciones de sacarosa en concentraciones de 0.2 a 1.0 g/L (figura A.2).

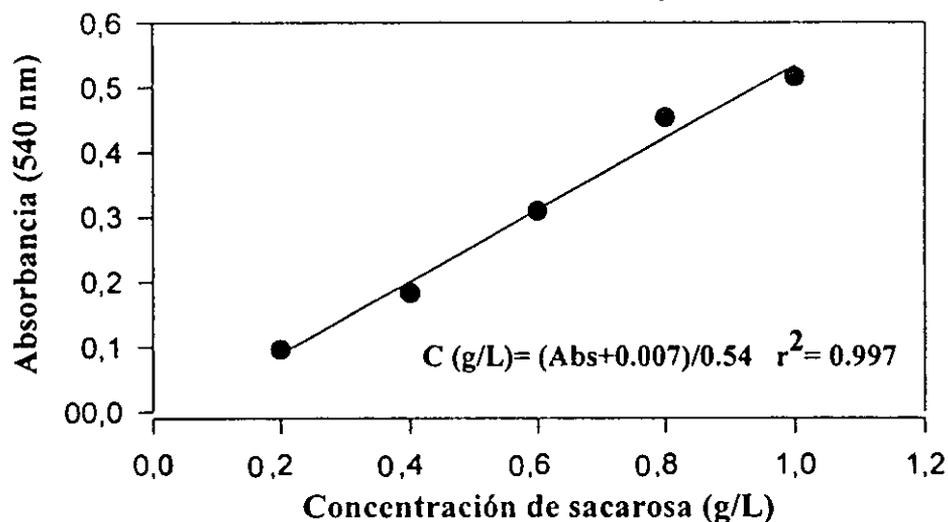


Figura A.2. Curva patrón para la determinación de sacarosa

1.5 Extracción y cuantificación de alginato (Jarman et al., 1978)

La técnica se basa en la precipitación del alginato con isopropanol y cuantificación gravimétrica del mismo.

Preparación de soluciones

Solución de EDTA (0.1 M). Disolver 1.9 g de etilendinitrotetracetato disódico (EDTA) en 50 mL de agua destilada.

Solución de cloruro de sodio (1.0 M). Disolver 2.92 g de cloruro de sodio en 50 mL de agua destilada.

Procedimiento

Se mezclaron 10 mL de caldo de cultivo con 1 mL Na₂EDTA (0.1 M) y 1 mL de NaCl (1.0 M) y posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm (centrífuga Beckman J2-HS) durante 20 min. Se separó el sobrenadante y se mezcló con 30 mL de isopropanol para la precipitación del producto. Por filtración se separó el precipitado y se resuspendió en 10 mL de agua desionizada por 10 minutos con agitación constante y se volvió a precipitar con el mismo volumen de isopropanol. El producto se filtró en membranas Whatman (No. 1, 1.6 μm de diámetro de poro), los cuales se secaron a 60°C

por 24 h (hasta peso constante). Finalmente se pesó el filtro y se calculó la concentración de polisacárido en el medio.

1.6 Determinación de polihidroxibutirato (PHB)

Este método se basa en la extracción del PHB con cloroformo e hipoclorito de sodio y su posterior medición espectrofotométrica en la región de luz ultravioleta (235 nm) (Law y Slepecky, 1961; Hahn *et al.*, 1993).

Preparación de soluciones

Cloruro de sodio. Pesar 0.9 g de cloruro de sodio y disolver en 100 mL de agua destilada.

Hipoclorito de sodio. Mezclar 30 mL de cloro comercial con 70 mL de agua destilada.

Solución de EDTA (0.1 M). Disolver 1.9 g de etilendinitrotetracetato disódico (EDTA) en 50 mL de agua destilada.

Solución de cloruro de sodio (1.0 M). Disolver 2.92 g de cloruro de sodio en 50 mL de agua destilada.

Procedimiento

Se mezclaron 10 mL de caldo de cultivo con 1 mL Na₂EDTA (0.1 M) y 1 mL de NaCl (1.0 M) y se centrifugaron a 12,000 rpm (centrífuga Beckman J2-HS) durante 20 min. El sobrenadante se separó para el análisis de alginato y el paquete celular se lavó en dos ocasiones con 3 mL de solución cloruro de sodio. Posteriormente, las células se lavaron con acetona al 100 % hasta que quedaron completamente libres de alginato. El paquete celular se secó en una centrifuga al vacío (Savant Mod. HCS) por espacio de una hora. Se pesaron 2.5 mg de células secas y se mezclaron con 2 mL de cloroformo (concentrado) y 2 mL de solución de hipoclorito de sodio en un tubo de ensaye con rosca. La mezcla se incubó a 29°C durante 1 h con agitación (400 rpm). Después de este tiempo, los tubos se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 min y se eliminó la fase acuosa por succión. La fase orgánica y los restos celulares se filtraron en una membrana Whatman del No. 1 (1.6 µm de diámetro de poro) y el filtrado (rico en cloroformo) se evaporó a 70°C por 20 min.. Al producto seco (rico en PHB) se adicionaron 10 mL de ácido sulfúrico concentrado y se calentó por 10 min a temperatura de ebullición. Finalmente, los tubos se enfriaron con hielo y se leyó la absorbancia a 235 nm usando ácido sulfúrico como blanco. Dependiendo de la concentración de PHB, se

realizaron diluciones 1/10 o 1/100, usando ácido sulfúrico concentrado previamente calentado a ebullición por 10 min. Los valores de absorbancia se extrapolaron en una curva patrón, la cual se elaboró utilizando concentraciones de PHB entre 1 y 5 µg/mL (figura A.3).

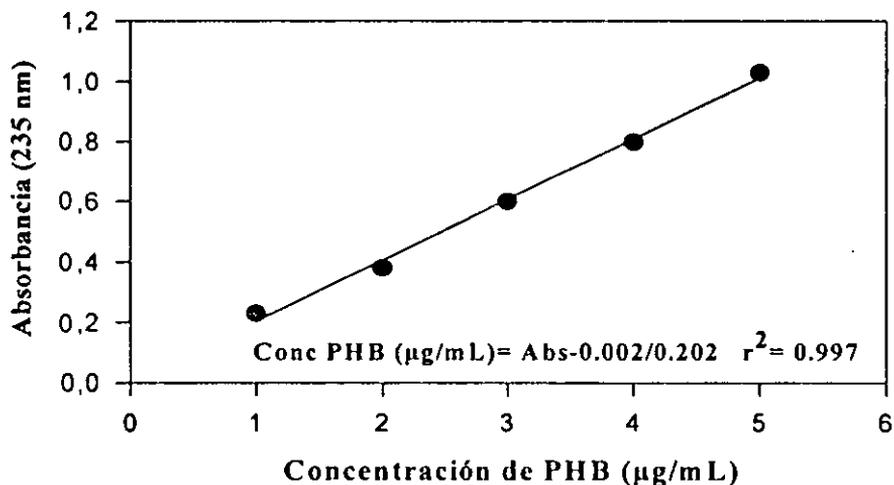


Figura A.3. Curva patrón para la determinación de la concentración de PHB

1.7 Determinación de la viscosidad

La viscosidad del caldo de cultivo se midió en un viscosímetro de cono y plato (Wells-Brookfield LVT, Series 82198). Todas las determinaciones se hicieron a temperatura ambiente (25°C) a 6 rpm y usando el cono CP-52, la cual corresponde a una velocidad de deformación de 12 s⁻¹.

1.8 Determinación del grado de acetilación de la molécula de alginato (método modificado de Mc Comb y Mc Cready, 1957)

Esta técnica se basa en la determinación colorimétrica del ácido aceto hidroxámico que se forma por la reacción del carbohidrato acetilado con hidroxilamina en solución alcalina.

Preparación de soluciones

Solución de hidróxido de sodio: Disolver 9.4 g de hidróxido de sodio en 100 mL de agua destilada.

Solución de clorhidrato de hidroxilamina: Disolver 3.75 g del reactivo mencionado con 100 mL de agua destilada.

Solución de ácido perclórico: Medir 70 mL de ácido perclórico concentrado y llevar a 100 mL con agua destilada.

Solución de perclorato férrico: Disolver 1.93 g de cloruro férrico en 5 mL de ácido clorhídrico concentrado. Posteriormente, agregar 5 mL de la solución de ácido perclórico, calentar y evaporar al vacío hasta total sequedad. Llevar a un volumen de 100 mL con agua destilada y mezclar 60 mL de esta solución con 8.3 mL de ácido perclórico. Enfriar con hielo y aforar a 500 mL con metanol absoluto. Esta solución es estable por una semana a temperatura ambiente.

Solución ácida de metanol: Enfriar en hielo 35.2 mL de ácido perclórico concentrado y aforar a 500 mL con metanol absoluto.

Solución estándar de pentacetato de glucosa: Disolver con calentamiento lento 0.623 g de β -D-(+) penta-acetato de glucosa en 30 mL de etanol absoluto. Aforar con 50 mL de agua destilada. Tomar alícuotas de 5, 10, 15 y 20 mL y aforar con 50 mL de agua destilada.

Procedimiento

Se pesaron 0.020 g de alginato previamente secado y se disolvieron en 10 mL de agua destilada. De aquí se tomaron 5.0 mL y se mezclaron con 1.0 mL de hidróxido de sodio y 1 mL de hidroxilamina. A la solución anterior se le adicionaron 5.0 mL de agua destilada y 5.0 mL de la solución ácida de metanol y se agitó durante 5 minutos. Se sirvió por goteo lento la solución de perclorato férrico hasta alcanzar un volumen total de 25 mL. Posteriormente, se leyó la absorbancia a 520 nm usando como blanco agua destilada con los reactivos. Los valores de absorbancia se extrapolaron en una curva patrón de β -D-penta-acetato, la cual se montó usando concentraciones de 0.005 a 0.017 g acetilo/L (figura A.4).

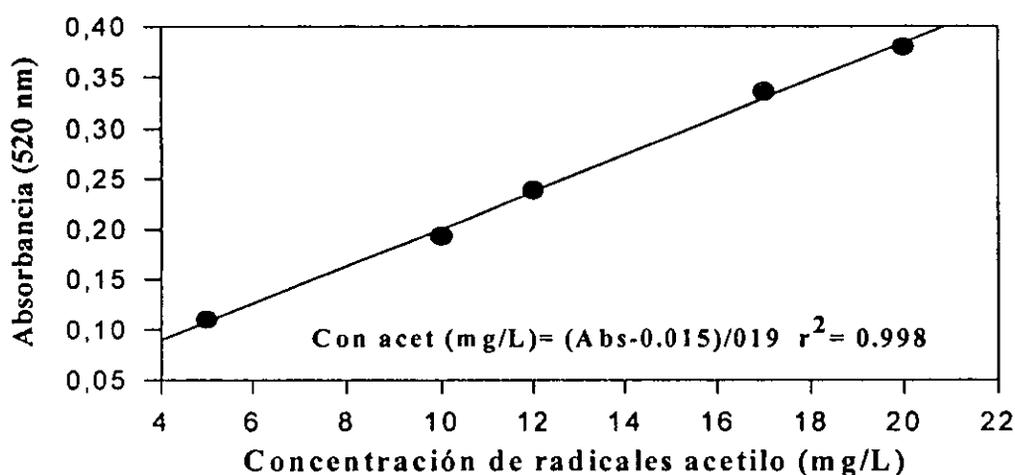


Figura A.4. Curva patrón para la determinación de radicales acetilo

El porcentaje de acetilos en el alginato se calculó usando la siguiente expresión:

$$\% \text{ de Acetilos (g/100 g de alginato)} = \text{Conc (g/l)} / 0.4 \times 100$$

1.9 Distribución de pesos moleculares

La distribución de pesos moleculares se determinó por cromatografía de filtración en gel (CFG) usando una serie de columnas Ultrahidrogel (UG 500 y 2000, Waters) de 7.8 mm (diámetro interno) por 300 mm, acopladas a un equipo de HPLC (Waters 625) con un detector de índice de refracción (Waters, 410). Como fase móvil se usó NaNO_3 0.1M a 35°C a un flujo de 0.9 mL/min. La señal del detector fue procesada con un programa PC compatible (Maxima GPC, Waters). La calibración de las columnas se llevó a cabo con un método estándar de calibración utilizando pululanos de *Aureobasidium pullulans* como estándares de peso molecular con un rango 5,800 a 1,600,000 daltones (Peña *et al.*, 1997).

II APENDICE DE CALCULO

Consideraciones teóricas

Con el propósito de evaluar las posibilidades teóricas de las hipótesis propuestas en el capítulo 3, se utilizó un modelo cinético-difusional, el cual se basa en el balance de masa para la difusión de oxígeno dentro de los microagregados en estado estacionario, dada por la siguiente expresión (Kurosawa *et al.*, 1989).

$$\frac{d^2 S_r}{dr^2} + \frac{n}{r} \cdot \frac{dS_r}{dr} - \frac{V_{max} S_r}{K_m + S_r} \cdot \frac{1}{D_e} = 0 \quad (1)$$

En estado estacionario, el perfil de concentración de sustrato (oxígeno en nuestro caso) a lo largo de los microagregados, está dada por la solución de la ecuación 1, bajo las condiciones frontera de $S_r=S_s$ a $r=R$; $dS_r/dr=0$ a $r=0$; donde D_e es el coeficiente de difusión efectivo; S_r es la concentración local de oxígeno en el interior de la partícula; S_s es la concentración de oxígeno en la superficie de los microagregados celulares R es el radio del microagregado; r es la distancia radial ; V_{max} es la velocidad máxima de respiración de la bacteria y K_m es la constante de Michaelis. Estos últimos parámetros fueron determinados usando los valores reportados en la literatura para el cultivo de *A. vinelandii* en condiciones controladas de oxígeno disuelto (Post *et al.*, 1983)

Esta ecuación describe el perfil de concentración de sustrato como una función del radio de la partícula. Dicha ecuación se resolvió por integración numérica con la ayuda del simulador ISIM (Salford University Industrial Center Ltd, Salford, England).

Es importante señalar que la resolución de la ecuación 1 se basa en las siguientes suposiciones: 1) las partículas o microagregados son en su mayoría de tipo esférico; 2) las células están homogéneamente distribuidas en los microagregados; 3) el oxígeno es el único sustrato limitante durante el proceso; 4) la velocidad de consumo de oxígeno, como función de la tensión de oxígeno disuelto, sigue una cinética de saturación y 5) la difusividad de oxígeno es constante en los microagregados celulares.

La ecuación 1 se puede expresar en forma adimensional, definiendo $r^*=r/R$; $\beta=Sr/K_m$ e incorporando el módulo de Thiele (Φ), un número adimensional que incluye los parámetros cinéticos de consumo de oxígeno (V_{max} y K_m), el radio de la partícula (R), y la difusividad efectiva del sustrato (D_e).

$$\Phi=R/2*(V_{max}/K_m D_e)^{1/2} \quad (2)$$

De tal forma que, la ecuación 1 puede escribirse de la siguiente manera:

$$\frac{d^2 \beta}{dr^2} = - \frac{\Phi^2 \beta}{1 - \beta} - \frac{2}{r^*} \cdot \frac{d\beta}{r^*} \quad (3)$$

Finalmente, en el trabajo se utilizó el factor de efectividad (η) como una forma de mostrar el efecto de la resistencia a la transferencia de oxígeno dentro de los microagregados celulares. Este parámetro fue definido como la relación entre la velocidad específica de consumo de oxígeno (VECO) en presencia de gradientes de oxígeno (microagregados) y la velocidad específica de consumo de oxígeno (VECO*) sin limitaciones difusionales.

De acuerdo con la definición, el factor de efectividad de oxígeno (η) está dado por la ecuación 4.

$$\eta= VECO/VECO^* \quad (4)$$

Hipótesis 1

En primer lugar se determinaron las constantes cinéticas del sistema (V_{max} y K_m) para la velocidad de consumo de oxígeno en ausencia de problemas difusionales, tomando como base los datos reportados en la literatura (Post *et al.*, 1983). Como se observa en la figura A.5, la velocidad de consumo de oxígeno con respecto a la tensión de oxígeno sigue una gráfica típica de saturación, con un valor de K_m (calculado mediante la gráfica de dobles recíprocos de Lineweaver-Burk) de 0.0087 mmoles O_2/L y de $V_{max}=114$ mmoles $O_2/g h$.

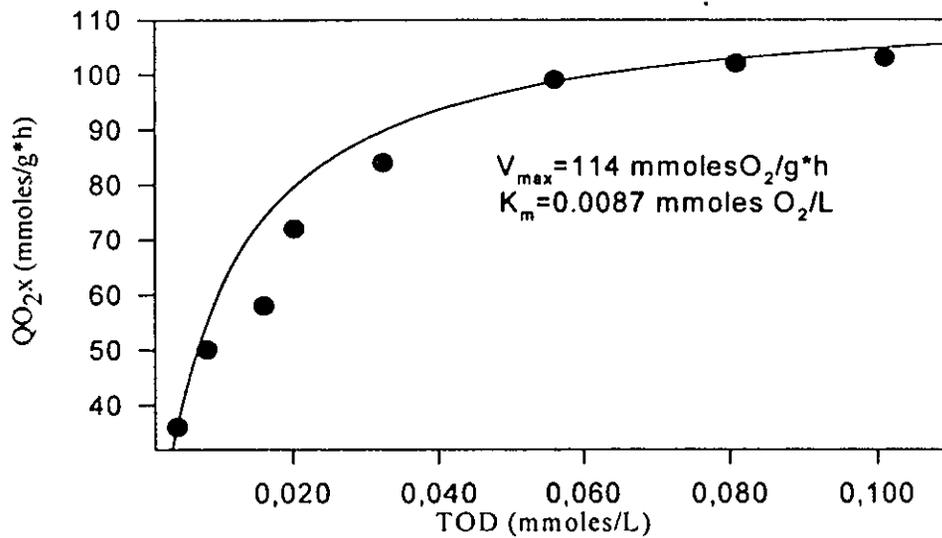


Figura A.5. Influencia de la tensión de oxígeno disuelto sobre la velocidad específica de consumo de oxígeno de *A. vinelandii* (datos reportados por Post, et al., 1983)

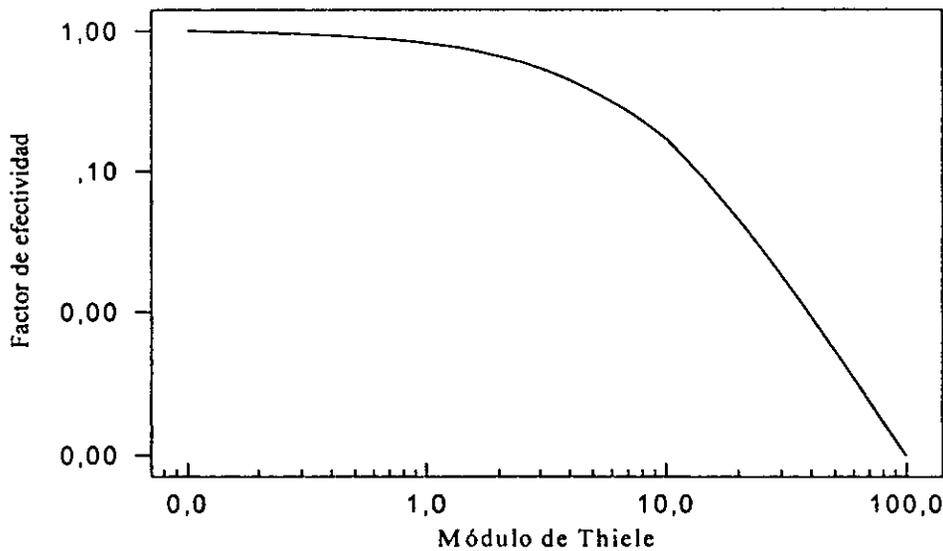


Figura A.6. Relación entre el módulo de Thiele (ϕ) y el factor de efectividad para una tensión de oxígeno del 3% (0.0063 mmoles/L)

Utilizando estos parámetros cinéticos y un coeficiente de difusividad de oxígeno en geles de alginato de $8.28 \times 10^{-2} \text{ cm}^2/\text{h}$ se generó una gráfica del factor de efectividad como una función del módulo de Thiele (figura A.6). En esta se observa, una caída en el factor de efectividad -definido

como la relación entre la velocidad de respiración en presencia de gradientes de oxígeno y la velocidad de respiración sin limitaciones difusionales- a partir de módulos de Thiele por arriba de 1.0. Con este valor se calculó un diámetro de agregado de 30 μm , el cual está dentro del rango determinado experimentalmente en el cultivo.

III APENDICE DE FIGURAS

En las siguientes páginas se presentan las cinéticas de fermentación para los cultivos desarrollados a diferentes tensiones de oxígeno disuelto (a velocidad de agitación constante de 300 rpm) y diferentes velocidades de agitación (a TOD constante del 3%). En dichas figuras se presenta el promedio de tres fermentaciones (puntos centrales) junto con las desviaciones estándar para cada punto experimental. Es importante señalar que el promedio de desviación estándar para el crecimiento, la producción de alginato y el consumo de sacarosa fue de 10, 9 y 8% respectivamente, mientras que para la viscosidad fue entre 10 y 15%.

Así también, se presentan una serie de figuras relacionadas con el perfil de pH y la evolución de los niveles de alimentación de oxígeno y nitrógeno (para el control de la tensión de oxígeno disuelto), para los diferentes cultivos desarrollados. Cabe señalar que, en general, el control de pH fue satisfactorio (alrededor de 7.0) para las diferentes condiciones evaluadas.

Finalmente, en este apartado se presentan las figuras correspondientes a los cálculos de velocidad específica de crecimiento (μ) y la constante α (constante Luedeking-Piret que asocia la producción de alginato al crecimiento), para la diferentes cultivos evaluados durante el estudio.

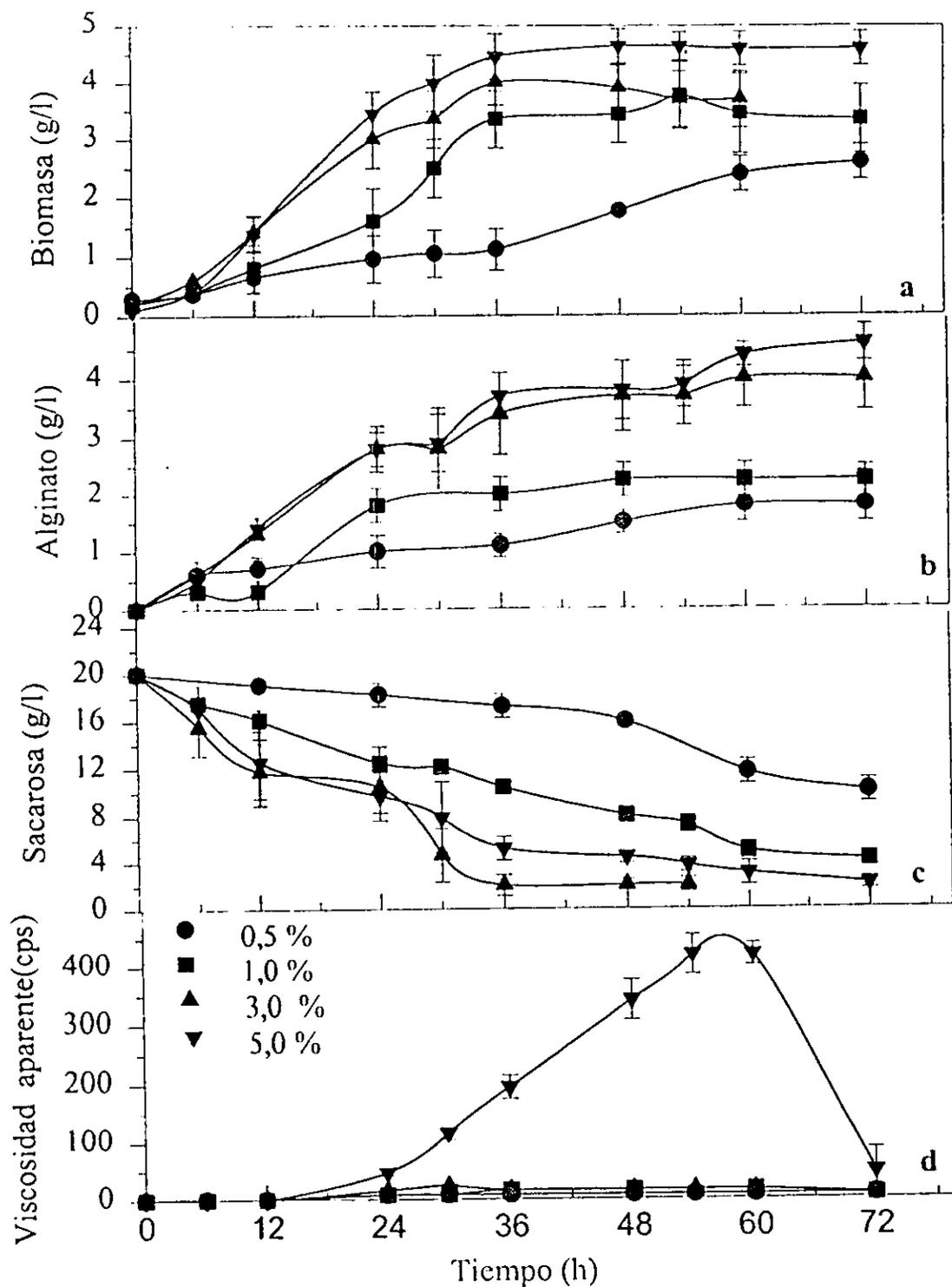


Fig. 1 Cinética de crecimiento (a), producción de alginato (b), consumo de sacarosa (c) y viscosidad del caldo (d) a diferentes tensiones de oxígeno disuelto.

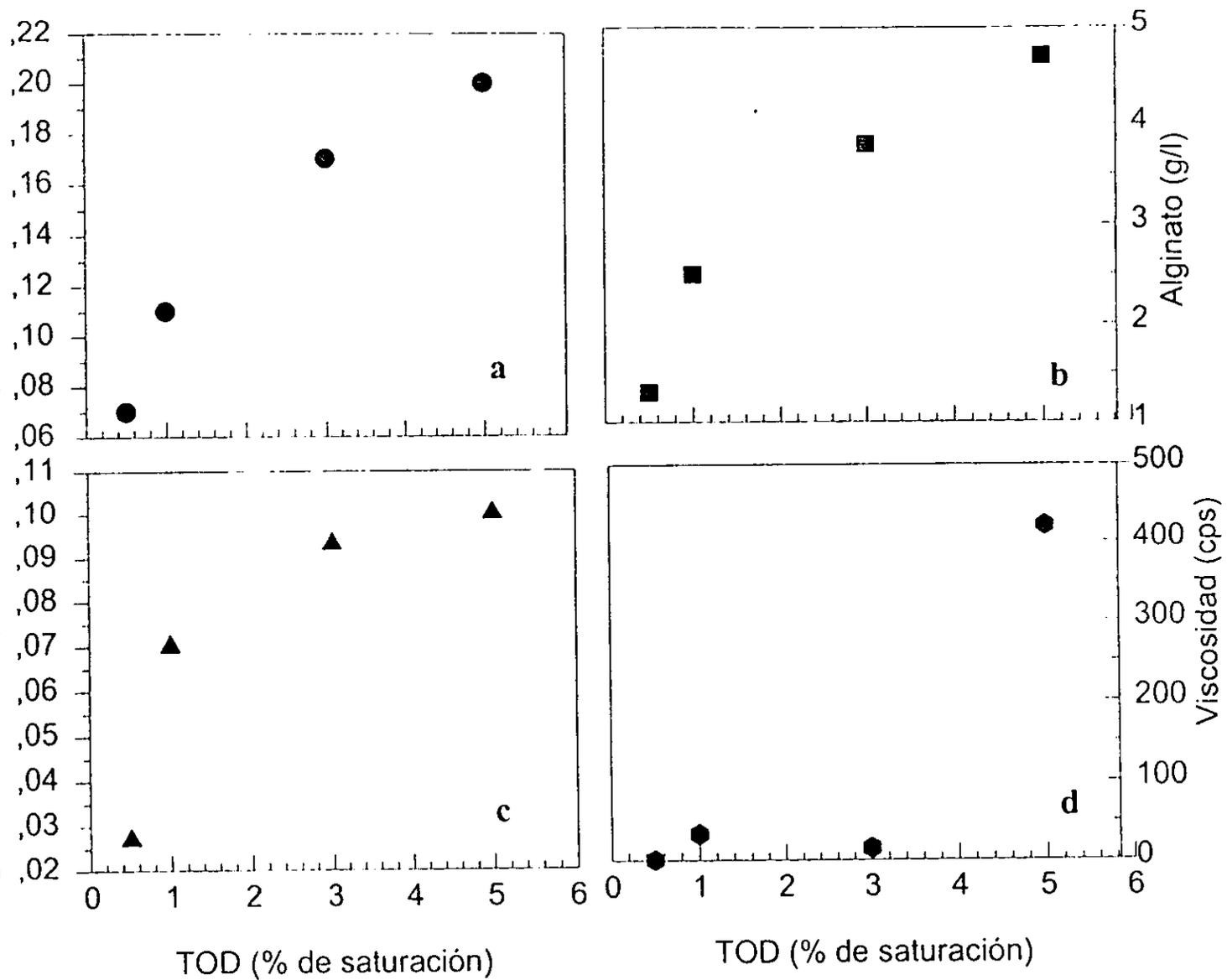


Fig. 2 Efecto del oxígeno disuelto sobre la velocidad específica de crecimiento (a) la concentración final de alginato (b); la velocidad de síntesis de alginato (c) y la viscosidad del caldo (d) durante el cultivo de *A. vinelandii*.

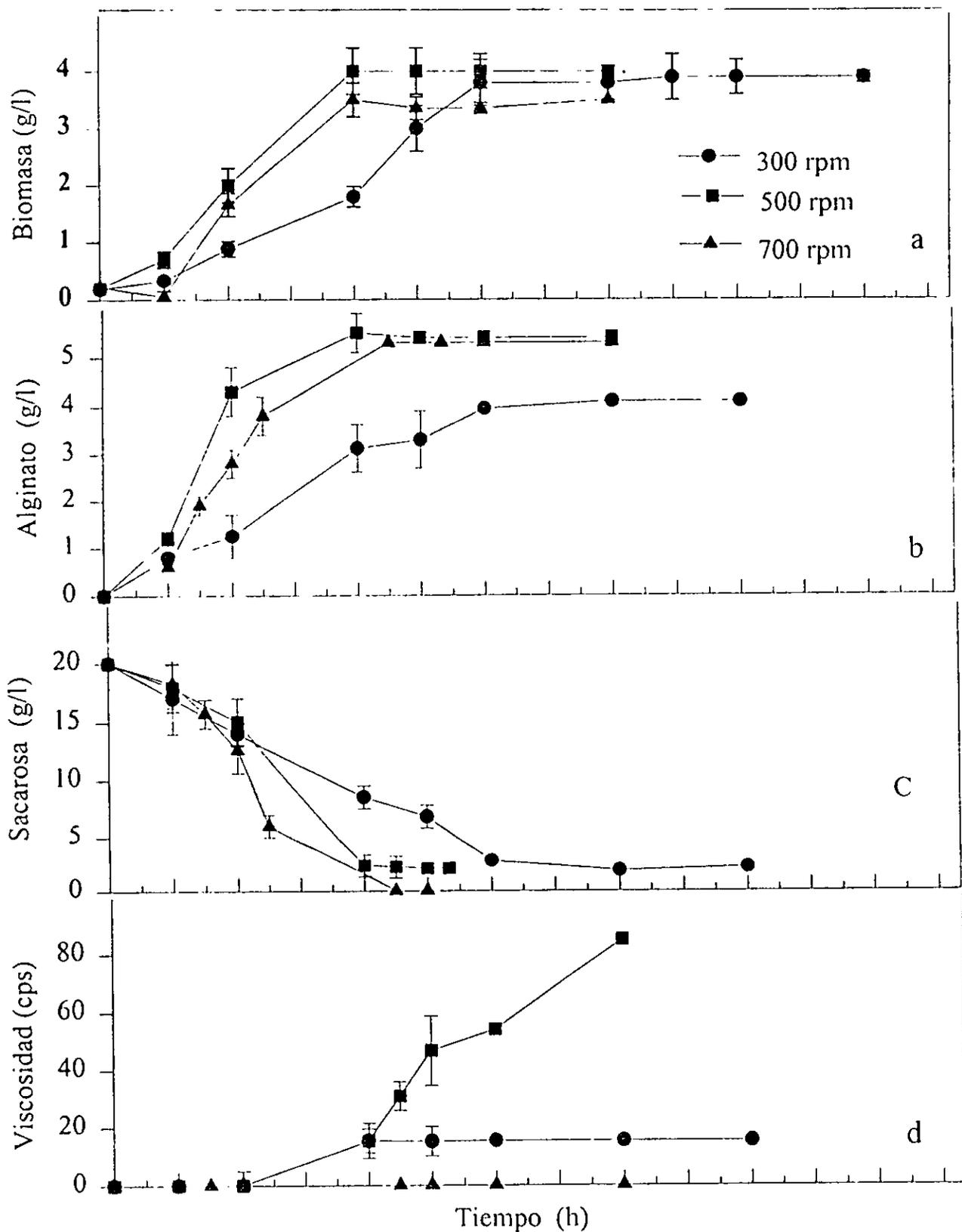


Fig. 3 Efecto de la velocidad de agitación sobre el crecimiento de *A. vinelandii* (a) la producción de alginato (b), el consumo de sacarosa (c) y la viscosidad del caldo (d) a una TOD constante del 3 %.

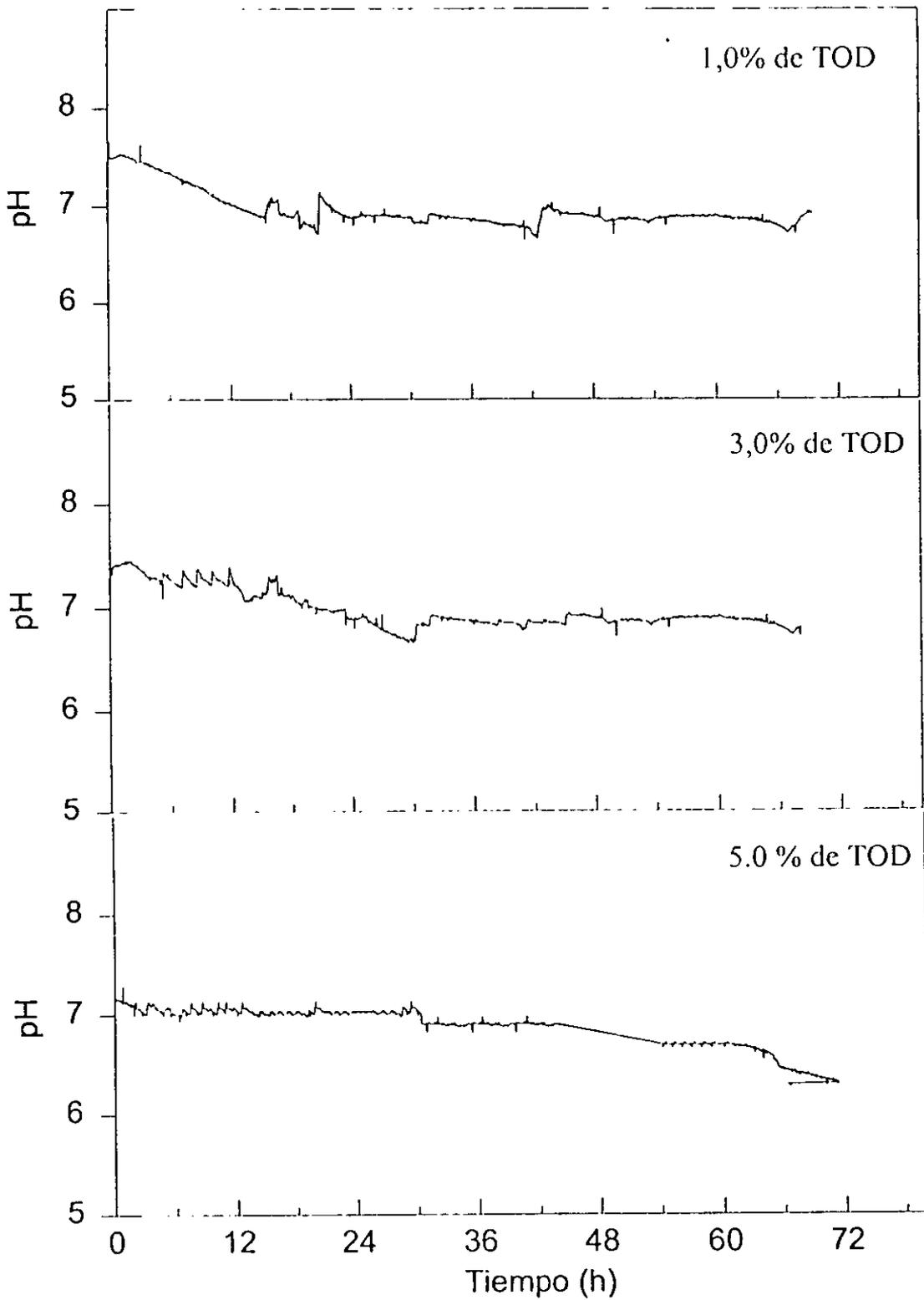


Fig. 4 Perfil de pH durante el cultivo de *A. vinelandii* a diferentes tensiones de oxígeno disuelto a velocidad de agitación constante de 300 rpm.

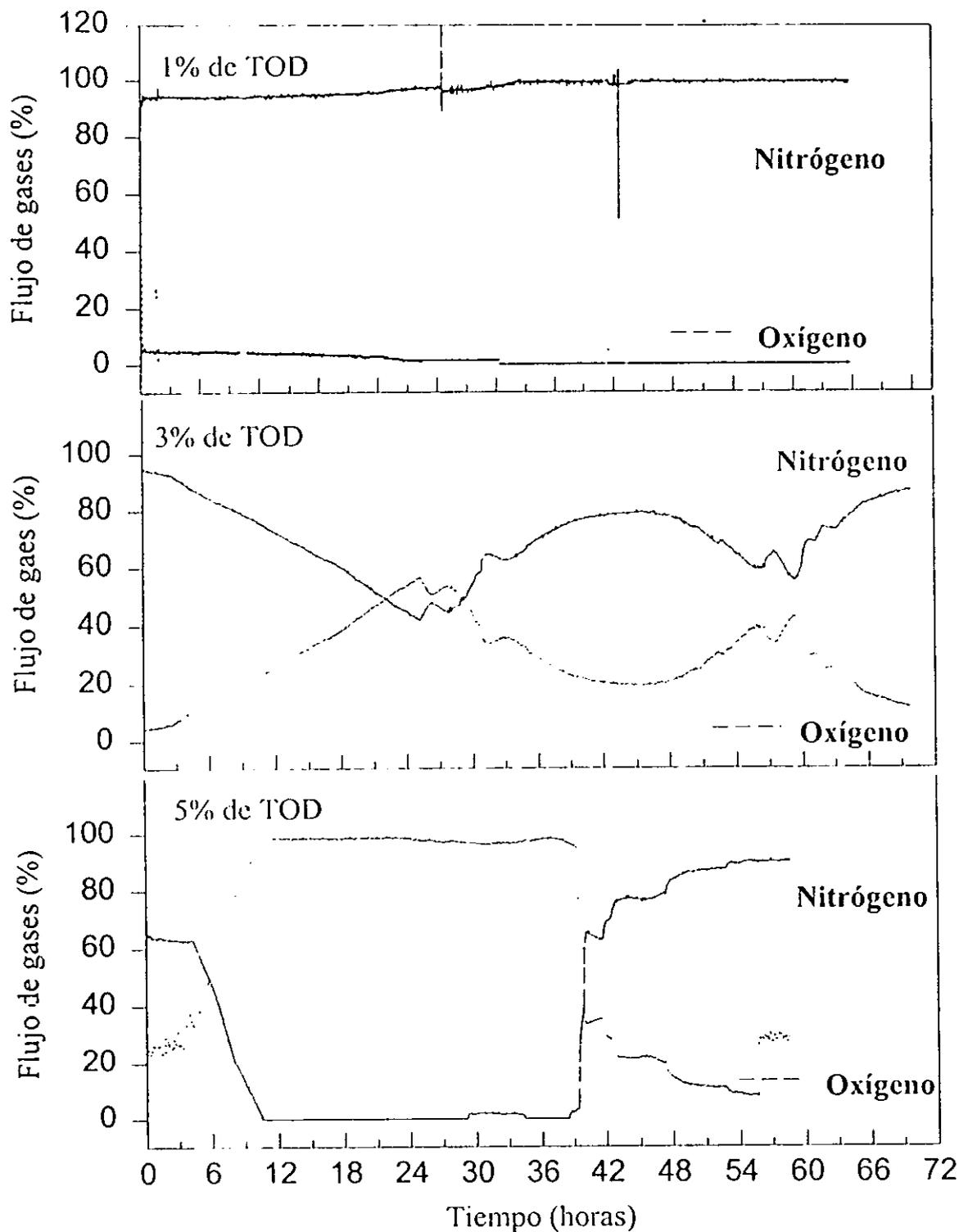


Fig. 5 Perfil de la alimentación de oxígeno y nitrógeno durante el cultivo de *A. vinelandii* a diferentes tensiones de oxígeno disuelto a una agitación constante de 300 rpm. Flujo de gases 800 ccpm.

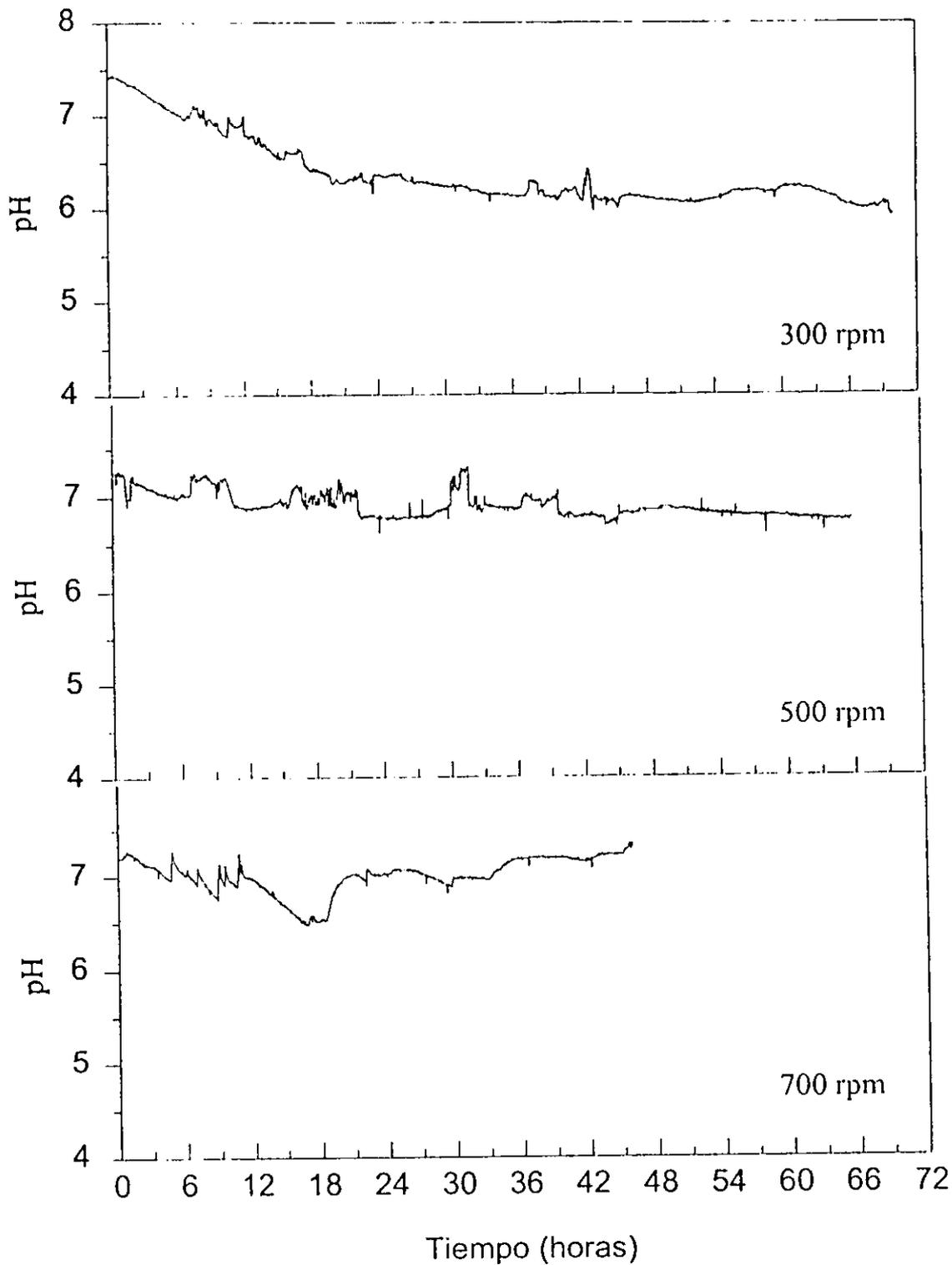


Fig. 6 Perfil de pH durante el cultivo de *A. vinelandii* a diferentes velocidades de agitación a una TOD constante del 3%

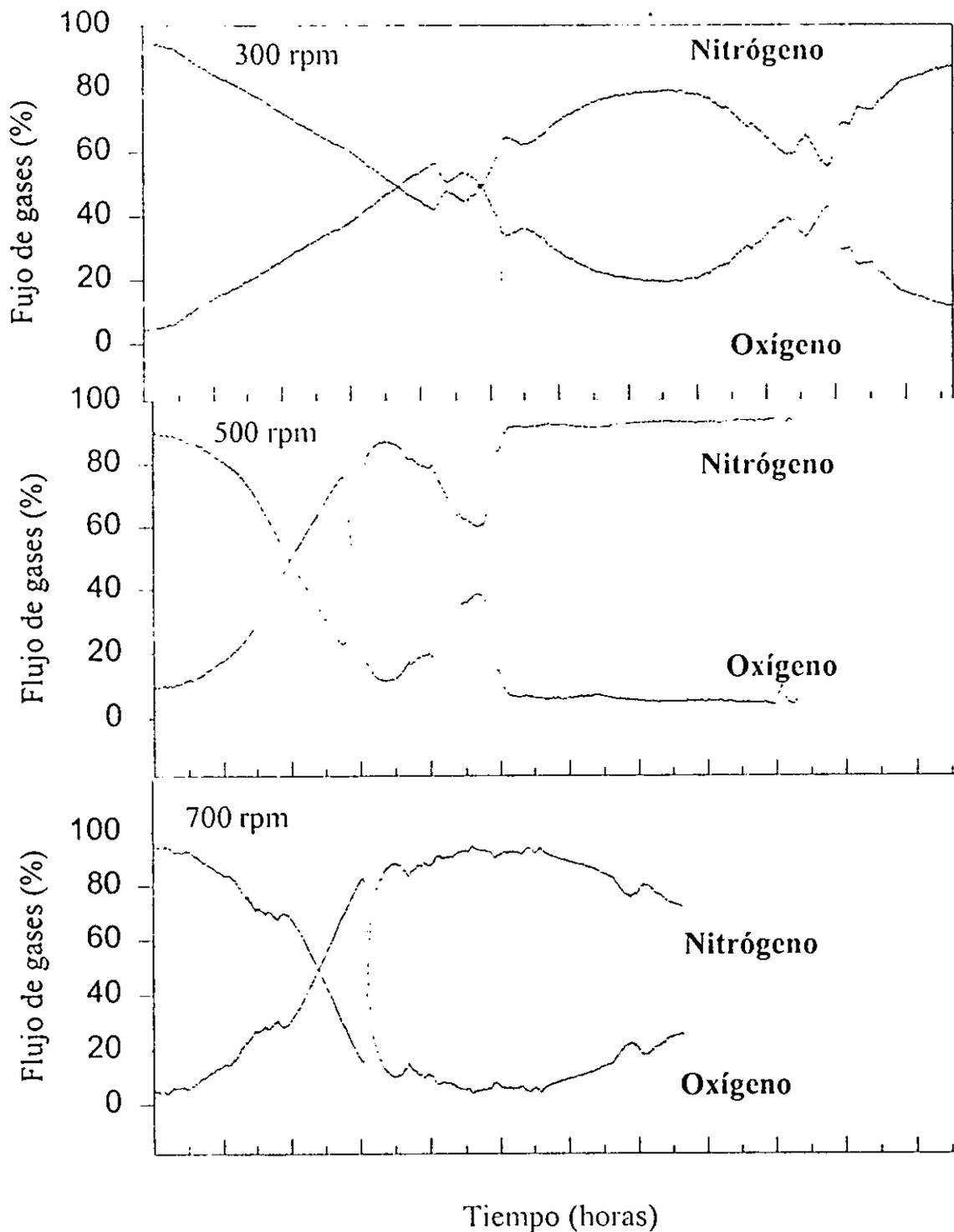


Fig. 7 Perfil de alimentación de oxígeno y nitrógeno durante el cultivo de *A. vinelandii* a diferentes velocidades de agitación a una TOD constante del 3%.

Flujo de gases 800 ccpm.

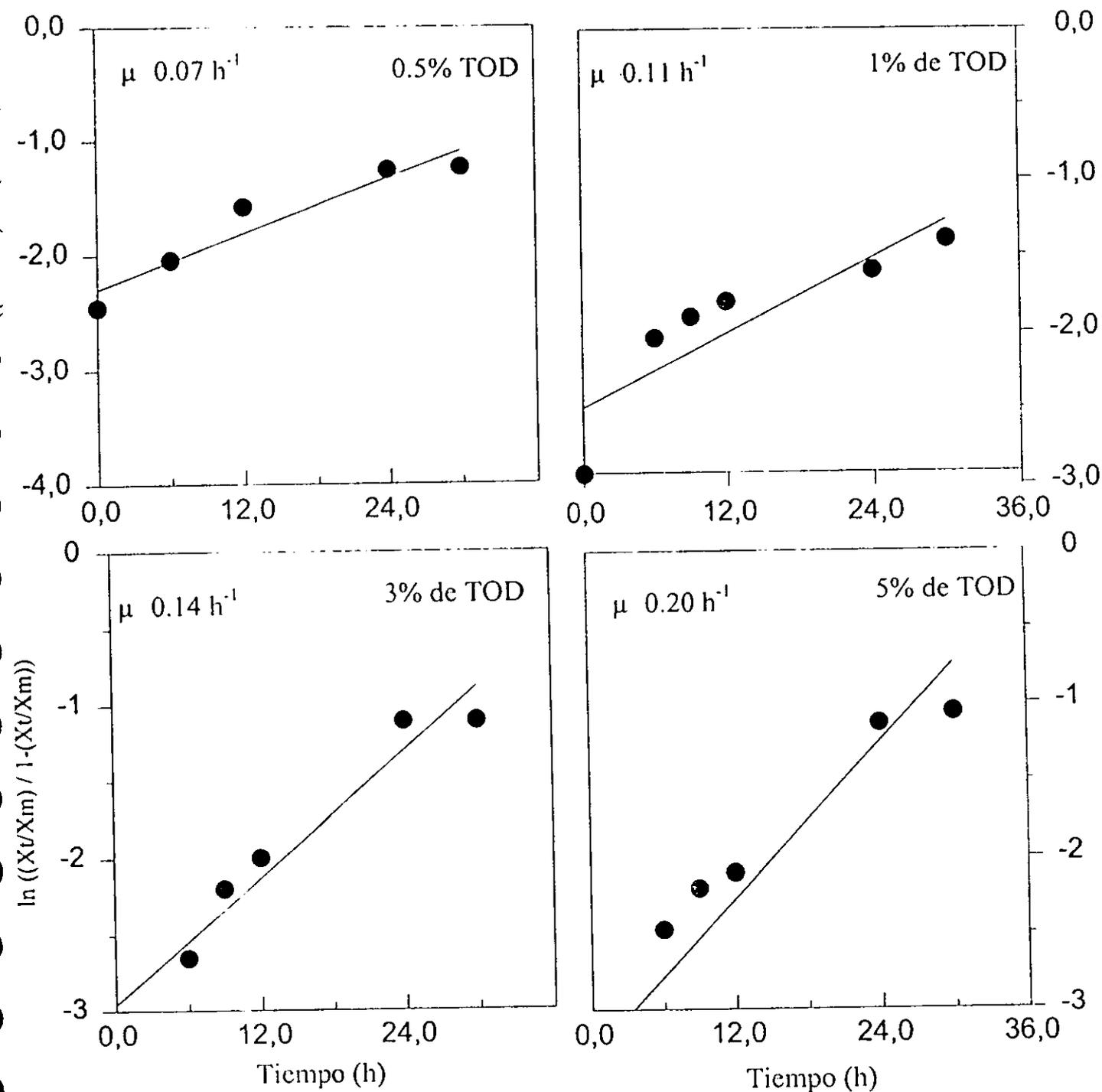


Fig. 8 Cálculo de la velocidad específica de crecimiento para el cultivo de *A. vinelandii* a diferentes niveles de oxígeno disuelto a una velocidad de agitación constante de 300 rpm.

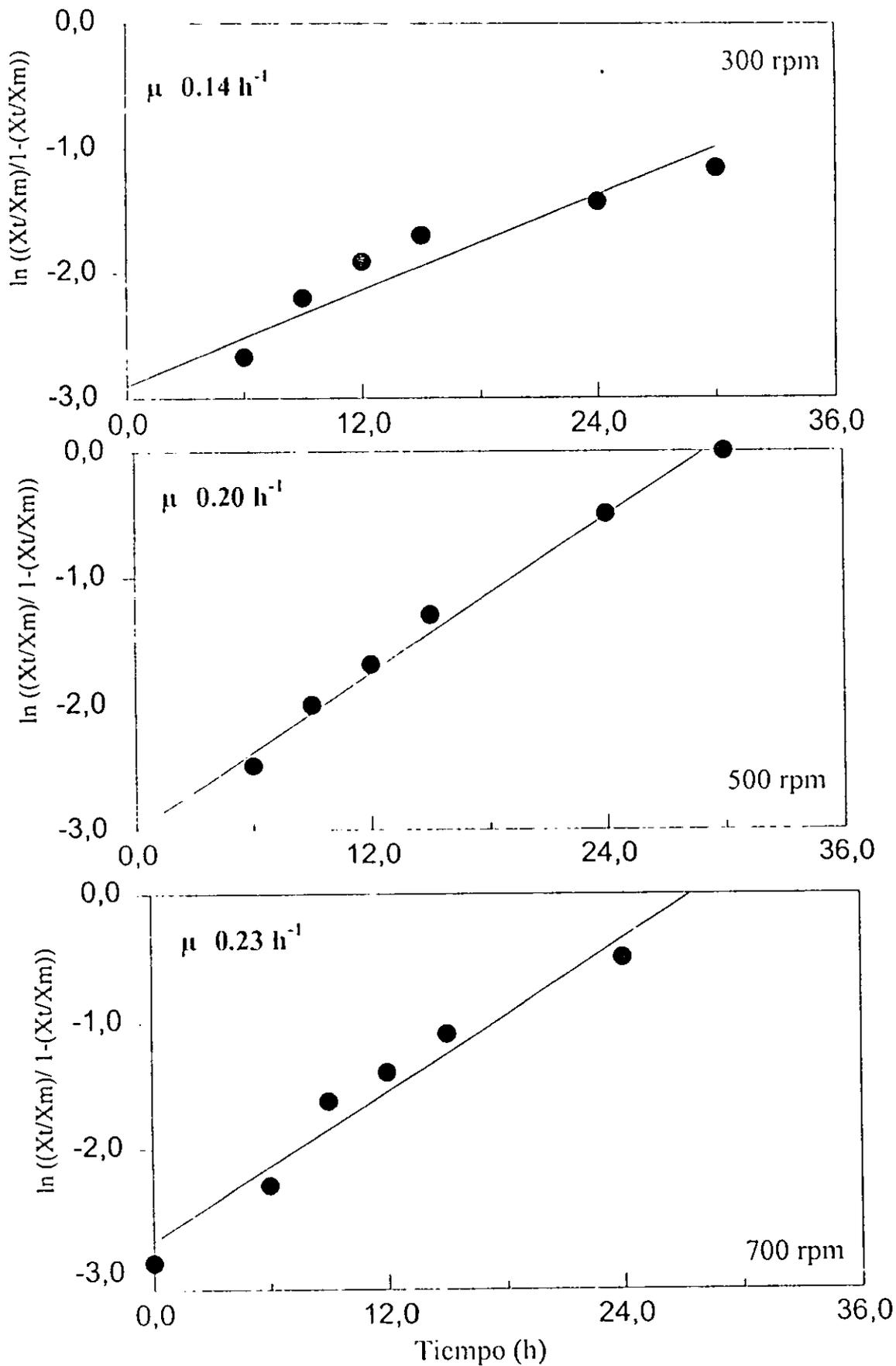


Fig. 9 Cálculo de la velocidad específica de crecimiento para el cultivo de *A. vinelandii* a diferentes velocidades de agitación a una TOD constante del 3%.

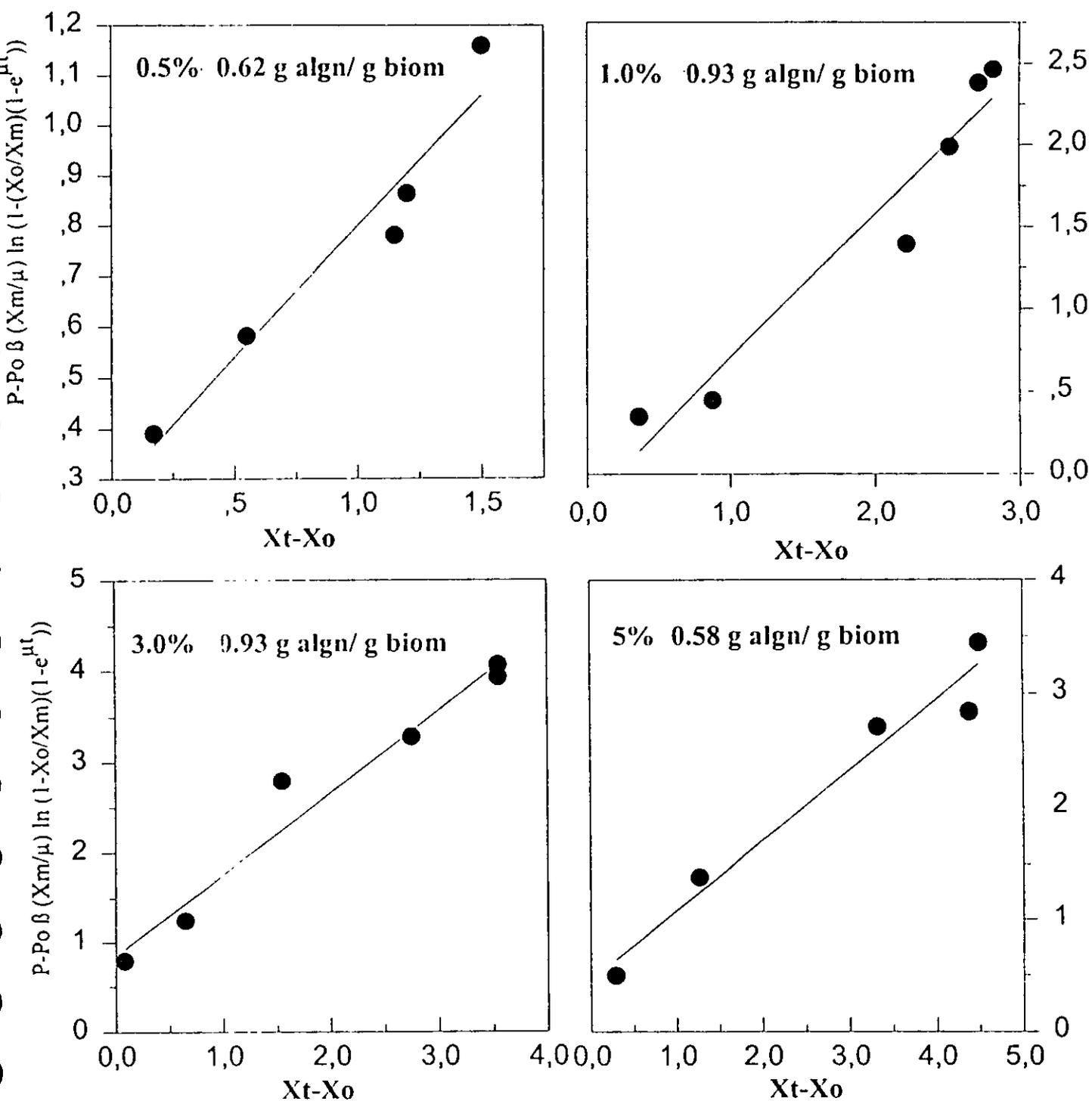


Fig. 10 Cálculo de las constantes alfa del modelo de Luedeking-Piret para la producción de alginato a diferentes niveles de oxígeno disuelto a una velocidad de agitación constante de 300 rpm.

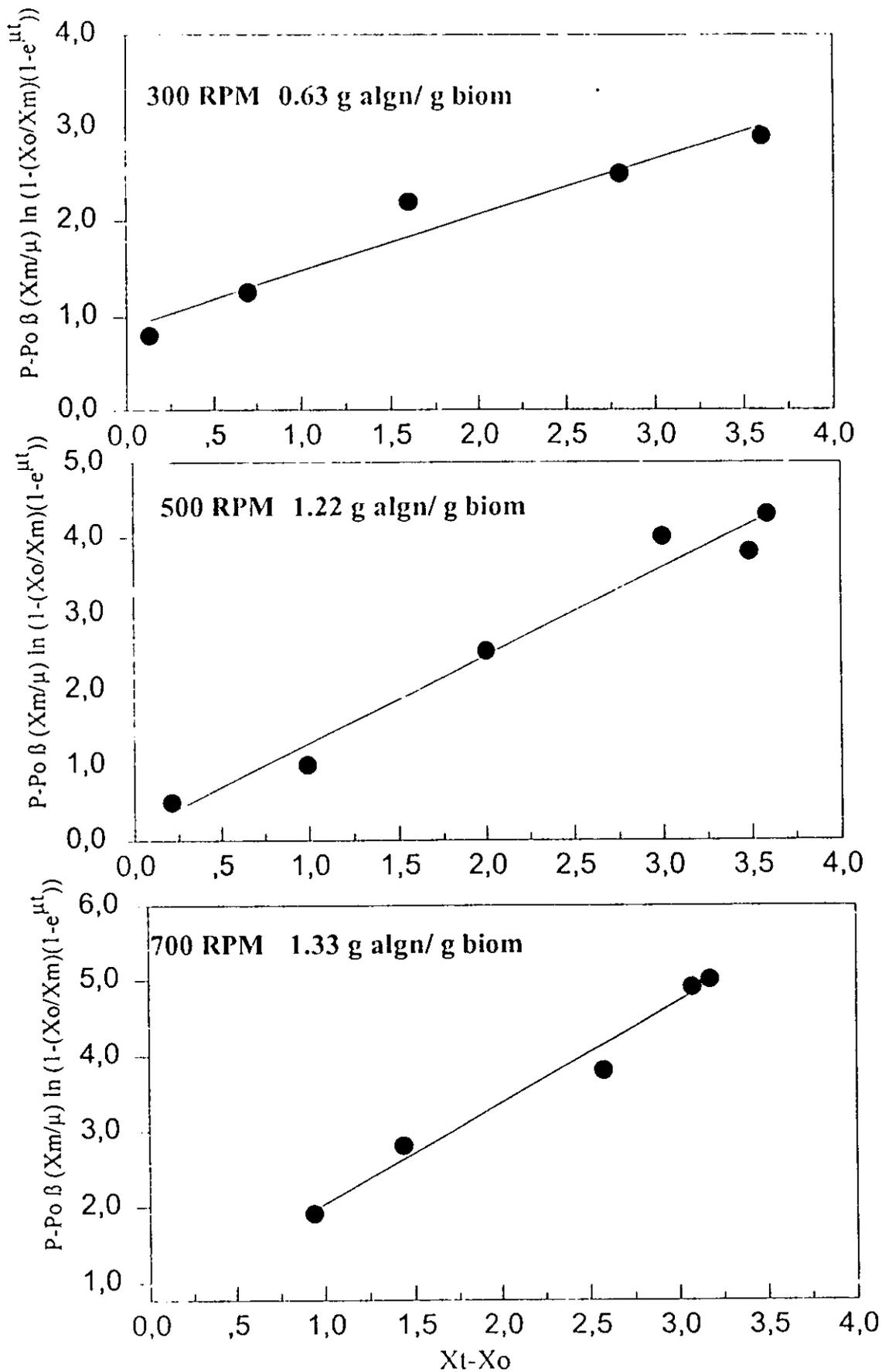


Fig. 11 Cálculo de las constantes alfa del modelo de Luedeking-Piret para la producción de alginato a diferentes velocidades de agitación a una TOD constante del 3%.

IV. BIBLIOGRAFIA

- Anderson, A., Hacking A., and Dawes, E. (1987). Alternative pathways for the biosynthesis of alginate from fructose and glucose in *Pseudomonas mendocina* and *Azotobacter vinelandii*. **J. Gen. Microbiol.** **133**: 1045-1052.
- Anderson, A., and Dawes, E., (1997). Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Microbiol. Rev.** **54**(4): 450-472.
- Annison, G., and Couperwhite, I. (1984). Consequences of the association of calcium with alginate during batch culture of *Azotobacter vinelandii*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** **19**:321-325.
- Annison, G., and Couperwhite I. (1986) Influence of calcium on alginate production and composition in continuous cultures of *Azotobacter vinelandii*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** **25**: 55-61.
- Brivonese, A., and Sutherland I. (1989) Polymer production by a mucoid strain of *Azotobacter vinelandii* in batch culture. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** **30**: 97-102.
- Cárdenas, A. (1997) Reología y asociación molecular en solución de poliuronatos de origen diverso. Tesis de Maestría, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Sonora, México.
- Chen, W., Chen J., Chang S., and Su C. (1985) Bacterial alginate produced by a mutant of *Azotobacter vinelandii*. **Appl. Environ. Microbiol.** **49**: 543-546.
- Clare, K. (1993) Algin. En: **Industrial gums. Polysaccharides and their derivatives**. Whistler, R.L. and J.N. BeMiller (eds). Academic Press, USA. pp 105-143.
- Cohen, G. (1963) Alginic acid production by *Azotobacter vinelandii*. **Nature** **13**:211.
- Davidson, I., Sutherland, I., and Lawson C. (1977). Localization of o-acetyl groups of bacterial alginate. **J. Gen. Microbiol.** **98**: 603-606.
- Deavin, L., Jarman, T., Lawson, C., Righelato R., and Slocombe, S. (1977). The production of alginic acid by *Azotobacter vinelandii* in batch and continuous culture. En: **Extracellular Microbial Polysaccharides**. Sandford, P. and Laskin A. (Eds). American Chemical Society, Washington, pp. 14-26.

- Draget, K.I., Skjak Bræk, G., and Smidsrod, O. (1994). Alginate gels: the effect of alginate chemical composition and molecular weight. **Carbohydr. Res.** **25**:31-38.
- Dreveton, E., Monot, F., Ballerini, D., Lecourtier, J., and Choplin, L. (1994) Effect of mixing and mass transfer conditions on gellan production by *Auromonas elodea*. **J. Ferment. Bioeng.** **77** (6): 642-649.
- Edebo, L. (1969) Desintegration of cells. In D. Perlman (de), *Fermentation Advances*, Academic Press, New York, pp 249.
- Flores, F., Torres G., and Galindo E. (1994) Effect of the dissolved oxygen tension during cultivation of *X. campestris* on the production and quality of xanthan gum. **J. Biotechnol.** **34**: 165-173.
- Finn, R. (1954) Agitation-aeration in the laboratory and in industry. **Bacteriol. Rev.** **18**: 254.
- Fyfe, J.A., and Govan, J.R. (1983) Synthesis regulation and biological function of bacterial alginate. En: **Progress in Industrial Microbiology**, Vol 18. M.E. Bunshell (ed), Elsevier, New York., pp 25-55.
- Gacesa, P. (1988) Alginates. **Carbohydr. Polym.** **8**: 161-182.
- Geddie, J., and Sutherland, I. (1994) The effect of acetylation on cation binding by algae and bacterial alginates. **Biotechnol. Appl. Biochem.** **20**: 117-129.
- Gibbs, A., and Seviour, R. (1996) Does the agitation rate and/or oxygen saturation influence exopolysaccharide production by *Aureobasidium pullulans* in batch culture? **Appl. Microbiol. Biotechnol.** **46**: 503-510.
- Gorin, P., and Spencer, F., (1966) Exocellular alginate from *Azotobacter vinelandii*. **Can J. Chem.** **44**: 993-998
- Grasdalen, H. (1983) High field, 1H-nmr spectroscopy of alginate: Sequential structure and linkage conformations. **Carbohydr. Res.** **118**: 255-260.
- Hahn, S., Chang, Y., Kim, B., Lee, K., and Chan, H. (1993) The recovery of poly (3-hydroxybutyrate) by using dispersions of sodium hypochlorite solution and chloroform. **Biotechnol. Techniques** **7**: 209-212.
- Haug, A., and Larsen B., (1971) Biosynthesis of alginate. Part II. Polymanuronic acid C-5 epimerase from *Azotobacter vinelandii* (LIPMAN). **Carbohydr. Res.** **17**: 297-308.

- Horan, N., Jarman, T., and Dawes, E. (1981). Effects of carbon sources and inorganic phosphate concentration on the production of alginic acid by a mutant of *Azotobacter vinelandii* and on the enzymes involved in its biosynthesis. **J. Gen. Microbiol.** **127**:185-191
- Horan, N., Jarman, T., and Dawes, E. (1983) Studies of some enzymes of alginic acid biosynthesis in *Azotobacter vinelandii* grown in continuous culture. **J. Gen. Microbiol.** **107**:59-64.
- Jarman, T., Deavin, L., Slocombe S., and Righelato R. (1978) Investigation of the effect of environmental conditions on the rate of exopolysaccharide synthesis in *Azotobacter vinelandii*. **J. Gen. Microbiol.** **107**: 59-64
- Jarman, T. (1979). Bacterial alginate synthesis. En: **Microbial Polysaccharides and polysaccharases**. Berkeley, R., Goody, G., Ellwood D. (Eds). Academic Press, London., pp. 35-49.
- Kennedy, C., and Toukdarian, A. (1987) Genetics of *Azotobacters*. Applications to nitrogen fixation and related aspects of metabolism. **Ann. Rev. Microbiol.** **41**: 227-258
- Kurosawa, H., Matsumara, M., and Tanaka, H. (1989) Oxygen diffusivity in gel beads containing viable cells. **Biotechnol. Bioeng.** **34**: 926-932.
- Larsen, B., and Haug A. (1971). Biosynthesis of alginate. Part 1. Composition and structure of alginate produced by *Azotobacter vinelandii* (LIPMAN). **Carbohydr. Res.** **17**:287-296.
- Law, H., and Slepecky, R. (1961) Assay of poly- β -hydroxybutyric acid. **J. Bacteriol.** **82**: 33-36.
- Lawford, H., and Rousseau, J. (1991) Bioreactor design considerations in the production of high-quality microbial exopolysaccharide. **Appl. Biochem. Biotechnol.** **28/29**: 667-684.
- Leitao, J., and Sa-Correia, I. (1993) Oxygen-dependent alginate synthesis and enzymes in *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Gen. Microbiol.** **139**: 441-445.
- Lin, P., Pankratz S., and Sadoff L. (1978) Ultrastructural and physiological changes occurring upon germination and outgrowth of *Azotobacter vinelandii* cysts. **J. Bacteriol.** **135**: (2): 641-646.
- Martinsen, A., Skjak-Braek G., Smidsrod O., Zanetti F., and Paoletti S (1991) Comparison of different methods for determination of molecular weight and molecular weight distributions of alginates. **Carbohydr. Polym.** **15**: 171-193.
- Mc Comb, A., and Mc Creadand, R. (1957) Determination of acetyl in pectin and in acetylated carbohydrate polymers. **Anal. Chem.** **29** (5): 819-821.

- Mejía, R., (1997) Caracterización del gen algK de *Azotobacter vinelandii*. Tesis de Doctorado en Biotecnología. UNAM.
- Miller, G. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Anal. Chem.** **31** (3): 426-428.
- Mitchel (1991) Rheology of alginate solutions y gels. Notes of the First course of alginates and their Applications. Recent progresses in research y technology. Trodheim, Norway. June 2-5.
- Morris, E. (1987). New and modified polysaccharides. En: **Food Biotechnology**. R. King and P.Cheetman (Eds). Elsevier Appl. Sci., NY, pp. 193-248.
- Morris, E. (1990). Comparison of the properties of alginates and carrageenans; En: **Gum and Stabilisers for the Food Industry**, G.O. Philips, P.A. Williams y D.J. Wedlock (eds); IRL Press at Oxford University Press. Oxford, pp 483-496.
- Okabe, E., Nakajima, M., Murooka, H., and Nisizawa K. (1981). Investigation of carbon and phosphorus sources in cultural media of a selected strain of alginate-producing *Azotobacter vinelandii*. **J.Ferment. Technol.** **59** (1): 1-7
- Pace, G. and Righelato, R. (1980) Production of extracellular microbial polysaccharides. **Adv. Biochem. Eng.** **15**: 41-70.
- Page, W. (1992). Production of poly- β -hydroxybutyrate by *Azotobacter vinelyii* UWD in media containing sugars y complex nitrogen sources. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** **38**:117-121.
- Page, W., and Sadoff H. (1976) Physiological factors affecting transformation in *Azotobacter vinelandii*. **J. Bacteriol.** **125**: 1080-1087.
- Peña, C., Campos, N., and Galindo, E. (1997) Changes in the molecular mass distributions, broth viscosity y morphology of *Azotobacter vinelandii* cultured in shake flasks. **Appl Microbiol. Biotechnol.** **48**: 510-515.
- Peters, H., Herbst, H., Hesselink, P., and Lunsdorf, H. (1989) The influence of agitation rate on xanthan production by *Xanthomonas campestris*. **Biotechnol. Bioeng.** **34**: 1393-1397.
- Pindar, D., and Bucke C., (1975). The biosynthesis of alginic acid in *Azotobacter vinelandii*. **J. Biochem.** **152**: 617-622.
- Post, E., Golecki R., and Oelze J. (1982) Morphological and ultrastructural variations in *Azotobacter vinelandii* growing in oxygen-controlled continuous culture. **Arch. Microbiol.** **133**: 75-82.

- Post, E., Kleiner, D., and Oelze, J. (1983) Whole respiration and nitrogenase activities in *Azotobacter vinelandii* growing in oxygen controlled continuous culture. **Arch. Microbiol.** **134**: 68-72.
- Reuss, M., Bajpai, K., and Berke, W. (1982) Effective oxygen-oxygen consumption rates in fermentation broths with filamentous organisms. **J. Chem. Tech. Biotechnol.** **32**: 81-91
- Saddof, H (1975). Encystment and germination in *Azotobacter vinelandii* **Bacteriol. Rev.** **39**: 516-539.
- Sandford, P., and Baird, J. (1983). Industrial utilization of polysaccharides. En: **The Polysaccharides**. G. Aspinall (Ed). Vol. 2 Academic Press, New York, pp. 411-491.
- See-Shown, S. (1989). A mechanistic study of highly viscous fermentations. PhD thesis, Massachusetts Institute of Technology, Boston, MA, USA:.
- Sengha, S., Yerson, A., Hacking, A., and Dawes, E. (1989) The production of alginate by *Pseudomonas mendocina* in batch y continuous culture . **J. Gen. Microbiol.** **135**: 759-804.
- Serrano-Carreón, L., Salcedo, G., Ramírez, M.E., and Galindo, E. (1995) Kinetics and broth rheology evolution during xanthan production by *Xanthomonas campestris* cultured in shake flasks. **Asia Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol.** **3**: 67-73.
- Singh, S., Hogan, S., Feingold, D., and Larsen, B. (1987) Mucoïd strains of *Pseudomonas aeruginosa* are devoid mannuron C-5 epimerase. **Microbios** **51**:7-13.
- Skjak-Braek, G., Grasdalem H. and Larsen L. (1986) Monomer sequence and acetylation pattern in some bacterial alginates. **Carbohydr. Res.** **154**: 239-250.
- Skjak-Braek, G., Zaneti, F., and Paoletti S. (1989) Effect of acetylation on some solutions and gelling properties of alginates. **Carbohydr. Res.** **185**: 131-138.
- Skjak-Braek, G., and Martinsen, A. (1990) En: **Seaweed Resources in Europe**. G. Blunden & M. Guiry. Heydon & Son, London.
- Stephenson, P., Jackson, F., and Dawes, E. (1978) Further observations on carbohydrate metabolism and its regulation in *Azotobacter vinelandii*. **J.Gen. Microbiol.** **109**:89-96.
- Sutherland, I. (1977) Bacterial polysaccharides-their nature and production. En: **Surface Carbohydrates of the Prokaryotic Cell**. Sutherland I.(Ed). Academic Press, London, pp. 27-96.
- Sutherland, I. (1990) **Biotechnology of Microbial Exopolysaccharides**. Cambridge University Press, New York.

- Sutherland, I. (1994) Structure-function relationships in microbial exopolysaccharides. **Biotechnol. Adv.** **12**: 393-448.
- Tinoco, R. (1993). Obtención de alginatos bacterianos por fermentación líquida de *Azotobacter vinelandii*. **Tesis de Maestría**. Programa de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.
- van Suijdam, J., Kossen, W., and Joha, A. (1978) Model for oxygen transfer on shake flasks. **Biotechnol. Bioeng.** **20**: 1695-1709.
- Wecker, A., and Onken, V. (1991) Influence of dissolved oxygen concentration and shear rate on the production of pullulan by *Aureobasidium pullulans*. **Biotechnol. Lett.** **13** (3): 155-160.
- Zertuche-González, F. (1994) Situación actual de la industria de las algas marinas productoras de ficocoloides en México. Programa Cooperativo Gubernamental, FAO-Italia. Proyecto Aquila II. Documento de campo No. 13.