

03072

B
2ei



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

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

OBTENCION DE ALGINATOS BACTERIANOS
POR FERMENTACION LIQUIDA DE *Azotobacter*
vinelandii

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA
P R E S E N T A :
JOSE RAUNEL TINOCO VALENCIA

CUERNAVACA, MORELOS

1993

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está 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.

CONTENIDO

Página

I) RESUMEN	1
II) INTRODUCCION	3
III) OBJETIVOS	9
IV) GENERALIDADES	10
ASPECTOS GENERALES DE LOS POLISACARIDOS MICROBIANOS	10
Composición química de exopolisacáridos	13
Biosíntesis de polisacáridos microbianos	15
Polisacáridos comerciales	20
ASPECTOS GENERALES DE ALGINATOS	24
Estructura y propiedades de los alginatos	25
Organismos que producen alginatos	29
Biosíntesis de alginato	31
Fisiología de síntesis de alginatos	34
Principales usos de alginatos	36
V) MATERIALES Y METODOS	39
MICROORGANISMO	39
MEDIO DE CULTIVO	39
MANTENIMIENTO DE LA CEPA	40
AISLAMIENTO DE COLONIAS	40
PREPARACION DE INOCULOS	40
FERMENTACIONES	41
ESTUDIO DE LA COMPOSICION DEL MEDIO DE CULTIVO	42
TECNICAS ANALITICAS	42
Cuantificación del crecimiento microbiano	42
Cuantificación del alginato	42
Cuantificación de sacarosa	43
Medición de viscosidad	43

VI) RESULTADOS Y DISCUSION	45
Experimentos preliminares	45
Comparación de la producción de alginatos por las cepas C15 y WTC13 de <i>A. vinelandii</i>	46
Efecto de la concentración inicial de iones fosfato en la producción de alginato	48
Adición de una fuente de nitrógeno al medio de cultivo	49
Producción de alginato bajo diferentes concentraciones iniciales de acetato de amonio y extracto de levadura	52
Producción de alginato bajo diferentes condiciones de aireación	54
Producción de alginato bajo diferentes concentraciones iniciales de sacarosa	56
Cinética de fermentación en matraces de 250 mL	59
Cultivos en fermentador de dos litros	61
Cultivos en fermentador de dos litros modificando las condiciones de aireación y agitación	62
Modelos matemáticos para describir los datos experimentales	64
Cálculo de las constantes involucradas en los modelos matemáticos	67
VII) CONCLUSIONES	78
VIII) BIBLIOGRAFIA	80

I) RESUMEN

Los procesos biotecnológicos adquieren cada vez mayor importancia dentro del marco de producción industrial de polisacáridos. Se han desarrollado procesos tanto fermentativos como enzimáticos para la producción de polisacáridos de origen microbiano. Algunos ejemplos son la xantana, la dextrana, el ácido polihidroxiabútrico y el ácido hialurónico que exitosamente han sido introducidos al mercado de polímeros hidrosolubles. En estado de desarrollo a nivel de planta piloto, se encuentra otro grupo de estos biopolímeros como el escleroglucano, el curdlano, las levanas, las puluianas y los alginatos, entre otros. En el caso particular de los alginatos bacterianos, su producción a gran escala no ha sido posible, debido a la dificultad de desarrollar cepas estables y con altos rendimientos de alginato.

A diferencia de los alginatos derivados de algas marinas, los cuales son muy heterogéneos en su composición química, los alginatos bacterianos pueden producirse con una composición química uniforme mediante el control de las condiciones de cultivo. Con base en lo anterior, el objetivo principal de este trabajo fue establecer las condiciones de cultivo a nivel de matraz y fermentador de dos litros para la producción de alginatos utilizando una cepa de *Azotobacter vinelandii*.

En la primera parte del trabajo, se utilizó una cepa que presentó serios problemas en la estabilidad de producción de alginato. En un esfuerzo por obtener una cepa estable, se analizaron colonias separadas y se observó que la cepa de trabajo estaba constituida por un cultivo mixto de *Azotobacter vinelandii* y una especie del género *Rhizobium*.

En la segunda parte, se trabajó con una cepa aislada y purificada proveniente de la cepa de colección *A. vinelandii* ATCC-9046, la cual produjo 1.2 g/L de alginato en medio Burk que no contiene nitrógeno. Se seleccionaron las concentraciones de los componentes del medio en las cuales se obtuvo la mayor producción del polímero. Estas fueron: fosfatos (5 mM), sacarosa (20 g/L). Además, con una relación volumen de medio/volumen de matraz (0.2) en un matraz de 250 mL y la adición de extracto de levadura (3 g/L) se logró producir hasta 4.0 g/L del polisacárido. Este nivel de producción originó una viscosidad en el medio de cultivo de 400 cps medida en viscosímetro Brookfield de cono y plato a una velocidad de deformación de 12 s⁻¹.

Se realizaron cultivos en fermentador de dos litros sin control de oxígeno disuelto en el medio (se permitió que el oxígeno disuelto se mantuviera en 0 % de saturación durante el tiempo de fermentación), así como fermentaciones en las que se mantuvo el oxígeno disuelto en un rango del 10 al 15 % durante la

fermentación. En las fermentaciones con control de oxígeno se produjo mayor cantidad de alginato en un menor tiempo de incubación (5.4 g/L en 60 h, contra 4.3 g/L en 72 h para el caso de las fermentaciones sin control de oxígeno). Sin embargo, la viscosidad que se observó en el medio de las fermentaciones con control de oxígeno fue considerablemente menor (280 cps) en comparación con la viscosidad de las fermentaciones sin control de oxígeno en las cuales se produjeron hasta 500 cps. Este hecho está relacionado con la estructura del polisacárido

Se utilizó un modelo matemático que describe adecuadamente la cinética de las fermentaciones en matraz de 250 mL, así como en fermentador de dos litros bajo dos condiciones diferentes de oxígeno disuelto en el medio. Dichos modelos son una herramienta que puede apoyar el escalamiento del proceso y son una contribución a las generalizaciones ya reportadas en la bibliografía.

Los rendimientos de alginato obtenidos en este trabajo son comparables con aquellos reportados en la bibliografía, sin embargo, pueden mejorarse con la optimización del medio de cultivo, el mejoramiento genético de la cepa y la selección de condiciones óptimas de aireación/agitación.

II) INTRODUCCION

Los polisacáridos tienen la capacidad de alterar el comportamiento de flujo del agua. Debido a ello, constituyen una parte importante en el mercado de los polímeros hidrosolubles y cuentan con aplicaciones directas en industrias como la farmacéutica, alimentaria y papelera, entre otras. Se ha descrito un número muy grande de polímeros que confieren a las soluciones acuosas propiedades reológicas tales como viscosidad, gelificación, suspensión de partículas, espesamiento, formación de películas, etc. Algunos ejemplos de dichos polímeros, se muestran en la **Tabla I**. Se destaca el hecho de que este tipo de productos son en su mayoría de origen vegetal, mientras que los polisacáridos de origen microbiano representan una fracción muy pequeña.

Como consecuencia de las fluctuaciones en los precios del petróleo, así como de la tendencia (sobre todo en el sector alimentario) hacia el consumo de productos naturales, en los últimos años se ha presentado una disminución en el uso de gomas sintéticas. En cambio, aumentó el interés en algunos polisacáridos tales como el almidón y la celulosa, considerándolos como recursos renovables para la producción de energéticos, rayón y otros químicos. Aunque es difícil establecer el volumen exacto de la producción de los polímeros hidrosolubles, se ha estimado que la producción global excede los cinco millones de toneladas por año. Este mercado lo constituyen los polisacáridos vegetales y microbianos en un 50 a 80%, el resto lo cubren los polímeros sintéticos (**Sandford y Baird, 1983; Yalpani y Sandford, 1987**).

Tabla I. CLASIFICACION DE GOMAS (Wells, 1977)

GOMAS NATURALES

Exudados de árboles
Extractos de plantas
Extractos de semillas
Algas marinas
Almidones de cereales
Almidones de tubérculos
Almidones de animales
Proteínas animales
Proteínas vegetales
Gomas microbianas

Arábigo, Tragacanto
Pectina
Guar, Algarrobo
Agar, Alginatos, Carragenina
Maíz, Sorgo
Papa, Tapioca
Glucógeno
Gelatina, Caseína
Soya
Dextrana, Xantana, Gelana, etc.

GOMAS MODIFICADAS O SEMISINTETICAS

Derivados de celulosa

Derivados de almidón
Otros

Carboximetilcelulosa,
Metilcelulosa, etc.
Dextrinas, Acetato de almidón
Metoxipectina, Alginato de
propilenglicol

GOMAS SINTETICAS

Derivados petroquímicos

Alcohol polivinílico
Polivinil pirrolodina
Poli-carboxivinil
Polímeros de óxido de etileno
Sales de ac. poliacrílico

La importancia relativa de algunos polisacáridos se refleja en el siguiente conjunto de datos: la producción mundial de fibras celulósicas fue de 3,230,000 toneladas en 1986. El consumo de productos derivados de almidón fue en Estados Unidos de 1,800,000 toneladas; el consumo de gomas naturales, incluyendo extractos de algas marinas, gomas de semillas y exudados de plantas fue de 43,000 toneladas por año. En la Tabla II se muestran otros datos del consumo global de polisacáridos industriales.

Tabla II. CONSUMO Y MERCADO DE POLISACARIDOS INDUSTRIALES EN ESTADOS UNIDOS (Yalpani y Sandford, 1987)

Producto	Consumo (ton/año)	Valor del mercado (10 ⁶ \$/año)
Agarosa	5,000	10
Alginato	23,000	115
Carragenina	6,000	100
Celulósicos:	16,000	
Acetato-	365,000	
Carboximetil-	38,000	
Etil-	-	
Hidroxietyl-	31,000	
Hidroxiopropil-	3,000	
Hidroxiopropilmetil-	-	
Metil-	16,000	3
Microcristalina	3,000	5
Quitina/Quitosano	450-850	0.5
Ciclodextrinas	650-700	
Dextrana	2,000	
Clínica	600	
Cromatografía	-	
Goma gelana	-	
Goma guar	67,000	
Goma arábica	9,000-11,000	
Acido hialurónico	500	100
Hidroxiopropil-guar	16,500	53
Goma karaya	3,000	
Algarrobo	5,000	
Pectinas	6,000-8,000	
Almidones	1,800,000	
Tragacanto	1,500	
Xantana	6,000	

Es posible concluir de estos datos que los polisacáridos vegetales constituyen la mayor parte del mercado. En tanto que los polisacáridos microbianos son las gomas introducidas al mercado mas recientemente. A pesar del gran número de productos con propiedades y estructuras interesantes, sólo algunos de ellos han alcanzado un nivel importante de producción industrial:

- a) La **xantana** obtenida de *Xanthomonas campestris*, de amplio uso en la industria de alimentos y como fluidos de perforación en pozos petroleros.

- b) Las **dextranas** derivadas de *Leuconostoc mesenteroides*, utilizadas como sustitutos del plasma sanguíneo, o como materia prima para la elaboración de resinas de cromatografía (Sephadex), así como en procesos de separación líquido-líquido.
- c) La goma **gelana** de *Pseudomonas elodea*, la cual en 1991 fue aceptada por la FDA (Food and Drug Administration) de Estados Unidos para su uso en alimentos. Esta goma tiene la capacidad para formar geles.
- d) El **poly-hidroxi butirato** de *Alcaligenes eutrophus*, de uso no alimentario, utilizado para elaboración de envases de plástico biodegradables.

Otros polisacáridos microbianos se encuentran en proceso de desarrollo a nivel de planta piloto, tal es el caso de los escleroglucanos de *Sclerotium* spp, el curdlano de *Agrobacterium* spp y *Alcaligenes faecalis*, la pululana de *Aureobasidium pullulans* y el alginato bacteriano de *Azotobacter vinelandii*. Cada uno de ellos posee características especiales que lo hace atractivo para un uso determinado. Sin embargo, se requiere tener ventajas técnicas notables para que los polisacáridos microbianos puedan desplazar a las gomas existentes ya que la introducción al mercado de un nuevo biopolímero es altamente costosa y lenta (Sandford *et al.*, 1984; Galindo, 1985).

Un aspecto de gran interés en la producción de polisacáridos microbianos es la capacidad de influir sobre su composición y propiedades, mediante el control de las condiciones de fermentación, además de la posibilidad de obtener un material de composición química uniforme. La enorme diversidad de polímeros

que son sintetizados por microorganismos permite plantear la posibilidad de encontrar un polisacárido con propiedades físicas de interés para prácticamente cualquier aplicación industrial (Pace, 1987).

Los alginatos representan un ejemplo clásico de un polímero cuyas propiedades pueden mejorarse al intentar producirlos por medio de un sistema de fermentación ya que la proporción de los monómeros estructurales en la molécula del polímero es resultado de la activación de la enzima que epimeriza residuos manurosilos a residuos gulurosilos en una etapa final de la biosíntesis del alginato. Esta enzima es dependiente de la concentración de iones calcio en el medio de cultivo. En altas concentraciones se favorece la formación de un polímero con alto contenido de ácido gulurónico (Larsen y Haug, 1971; Annison y Coperwhite, 1984). Por otra parte, es preferible utilizar cepas de *Azotobacter* en relación a las de *Pseudomonas aeruginosa*, ya que este último es un patógeno oportunista de las vías respiratorias de humanos. Las cepas mucoides de *P. aeruginosa* se han aislado de pacientes con fibrosis quística (May et al., 1991). En cambio, las especies del género *Azotobacter* son normalmente mucoides y mantienen esta capacidad bajo condiciones de crecimiento en el laboratorio (Gorin y Spencer, 1966).

Por otra parte, debe considerarse que el sustrato puede dirigirse tanto a la síntesis de exopolisacárido, como hacia el polisacárido intracelular de reserva (ácido polihidroxibutírico) generando bajos rendimientos de polisacárido extracelular (Brivonese y Sutherland, 1989). La síntesis de polihidroxibutirato

está asociada con la limitación de oxígeno, en cambio, un exceso de oxígeno provoca una mayor velocidad de respiración (Stephenson *et al.*, 1978). También se han estudiado otros factores que estimulan o afectan la síntesis de alginato por *A. vinelandii*, sin embargo, aún existen algunas limitantes sobre todo en el mejoramiento de cepas así como en la comprensión de la fisiología de síntesis y excreción de estos polímeros (Sutherland, 1989). Bajo esta perspectiva, los procesos de fermentación de alginatos no han logrado constituir una alternativa económicamente viable con respecto al material extraído de las algas marinas. Con estos antecedentes, se resalta la importancia de generar datos que contribuyan a incrementar los rendimientos en los procesos de fermentación para la obtención de estos compuestos.

III) OBJETIVOS

El **OBJETIVO GENERAL** del presente trabajo fue establecer las condiciones de cultivo para obtener la mejor producción de alginatos en matraces y en un fermentador de dos litros, utilizando una cepa de *Azotobacter vinelandii*.

Los **objetivos específicos** fueron los siguientes:

Analizar el efecto de la concentración inicial en el medio de cultivo de los iones fosfato y de la sacarosa sobre la producción de alginato.

Seleccionar una fuente de nitrógeno y la concentración adecuada para estimular la síntesis de alginato.

Analizar el efecto de la aireación en el medio sobre la síntesis de alginato.

Caracterizar la cinética de producción en matraces y en fermentador de 2 litros, proponiendo un modelo matemático que pueda ser de utilidad para el desarrollo del proceso.

IV) GENERALIDADES

ASPECTOS GENERALES DE LOS POLISACARIDOS MICROBIANOS

Un número muy grande de microorganismos sintetizan polisacáridos como componentes estructurales de su pared celular o como macromoléculas extracelulares (exopolisacáridos). Estos pueden estar asociados a otras macromoléculas de superficie, o bien pueden encontrarse desligados completamente de la célula, siendo liberados al medio como un mucílago amorfo. Como se demuestra en la Tabla III, se han caracterizado una gran cantidad de exopolisacáridos con propiedades atractivas para una potencial aplicación industrial, siendo las bacterias la fuente microbiana de preferencia debido a su fácil manejo en el laboratorio en relación a hongos, levaduras y microalgas.

Además de los polisacáridos propiamente dichos, las bacterias producen otros polímeros constituidos por azúcares. Un ejemplo son los lipopolisacáridos presentes en la pared celular de bacterias gram-negativas. Otro ejemplo son los peptidoglicanos de la pared celular de bacterias, constituidos por cadenas de polisacáridos entrecruzadas con cadenas peptídicas cortas formando una malla bidimensional. Un tercer ejemplo incluye a los ácidos teicoicos de la pared celular y membranas de bacterias gram-positivas. Estos tienen una estructura regular, en la cual, los residuos están conectados por uniones fosfodiéster (Kenne y Lindberg, 1983).

Tabla III. MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE POLISACARIDOS

HOMOPOLISACARIDOS

CELULOSA	<i>Acetobacter xylinum</i> <i>Rhizobium</i> y <i>Agrobacterium</i> spp <i>Sarcina ventriculi</i>
CURDLANA	<i>Alcaligenes faecalis</i> <i>Agrobacterium</i> y <i>Rhizobium</i> spp
ESCLEROGLUCANO	<i>Sclerotium rolfsii</i> y <i>S. glaucanicum</i> <i>Schizophyllum commune</i>
DEXTRANA	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
ELSINANO	<i>Elsinoe leucospila</i>
NIGERANA	<i>Aspergillus niger</i>
MUTANA	<i>Streptococcus mutans</i>
PULULANA	<i>Aureobasidium pullulans</i> <i>Tremella mesenterica</i> <i>Cyttaria harioti</i>
LEVANA	<i>Alcaligenes viscosus</i> <i>Zymomonas mobilis</i>
ACIDO POLI-SIALICO	<i>Neisseria meningitidis</i> <i>Escherichia coli</i>
1,2 β GLUCANO (cíclicos)	<i>Rhizobium</i> y <i>Agrobacterium</i> spp

HETEROPOLISACARIDOS

ALGINATO	<i>Azotobacter</i> spp <i>Pseudomonas</i> spp
GELANA	<i>Pseudomonas elodea</i>
GALACTOGLUCANO	<i>Zooglea ramigera</i>
ACIDO HIALURONICO	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
SUCCINOGLUCANO	<i>Rhizobium</i> spp
XANTANA	<i>Xanthomonas campestris</i>
EMULSAN	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>

Los polisacáridos microbianos puede diferenciarse en tres tipos (Margaritis, 1985; Pace, 1987):

- 1) **Polisacáridos intracelulares** que sirven como una fuente de carbono y energía almacenada.
- 2) **Polisacáridos estructurales** que son componentes de estructuras celulares tales como lipopolisacáridos y ácidos teicoicos presentes como parte integral de la pared celular.
- 3) **Polisacáridos extracelulares** que son mediadores en las relaciones de los microorganismos con el medio ambiente, incluyendo protección contra la desecación, barreras que impiden la unión de virus y anticuerpos en sitios específicos de la pared y en la interacción con otras células.

La mayoría de los polisacáridos de aplicación industrial se obtienen a partir de tejidos vegetales o de algas marinas. Sin embargo, una característica desfavorable es que su composición química depende del método de extracción, fuente, edad y tipo del tejido que se utiliza. Esto conduce a variaciones en sus propiedades físicas y consecuentemente, repercute en su funcionalidad. En contraparte, los polímeros producidos por vía microbiana presentan uniformidad en su composición química y mejores propiedades físicas en algunos casos. A pesar de estas ventajas, el mercado de los exopolisacáridos es aún muy reducido, aún cuando los procesos biotecnológicos representan una alternativa importante como sistemas de producción de estos biopolímeros o como métodos para modificar su estructura química con el fin de diversificar sus aplicaciones. Esta búsqueda de

alternativas para la industrialización de biopolímeros tiene un ejemplo muy notable en el caso de la goma xantana obtenida por fermentación de *Xanthomonas campestris*, el cual fue el primer polisacárido microbiano aceptado para uso en alimentos.

Composición química de exopolisacáridos.

La diversidad de estructuras que pueden adquirir los polisacáridos microbianos se deriva fundamentalmente de los siguientes factores:

-) La existencia de un número muy grande de carbohidratos que sirven de sillares estructurales los cuales pueden formar unidades repetitivas, variables en número y tipo de monómeros.
-) La posibilidad de formar diferentes tipos de enlace entre los monómeros, estos pueden ser de tipo α o β . Además, el enlace puede establecerse entre el átomo de carbono 1 del primer monómero y los átomos de carbono 2, 3, 4, o 6 del siguiente monómero en la cadena del polisacárido.
-) La presencia de compuestos sustituyentes de naturaleza química distinta a los azúcares tales como acetatos, piruvatos, etc.
-) La capacidad de formar cadenas de polisacáridos lineares o ramificadas.

Aunque son muchos los azúcares que pueden formar parte de los polisacáridos, existe una preferencia para la utilización de los azúcares neutros como la glucosa, manosa o galactosa, las cuales están presentes en muchos

exopolisacáridos en la forma piranosa. También son frecuentes las 6-desoxihexosas como L-fucosa y L-rhamnosa. En menor grado, los microorganismos utilizan ácidos urónicos como el ácido glucurónico, el ácido manurónico o el ácido galacturónico. En los polisacáridos microbianos también pueden encontrarse azúcares raros como las L-hexosas o las formas furanosas de glucosa o galactosa. En especies como *Escherichia coli* y *Neisseria meningitidis* se sintetizan exopolisacáridos poco comunes que contienen N-acetil-D-aminoazúcares como la N-acetil-D-glucosamina y la N-acetil-D-galactosamina, asimismo, se han identificado aminoazúcares muy raros como fucosamina y talosamina (Sutherland, 1990). Estos residuos no se han identificado en los exopolisacáridos de interés biotecnológico, como puede verse en la **Tabla IV**, donde se mencionan algunos ejemplos de los azúcares monoméricos y las estructuras de algunos polisacáridos microbianos típicos.

Además de los azúcares estructurales, los polisacáridos microbianos contienen sustituyentes laterales como acetato, piruvato, succinato, componentes lipídicos, nitrógeno orgánico o iones inorgánicos. Estos grupos laterales están presentes casi exclusivamente en los heteropolisacáridos. El grado de sustitución por estos grupos, tiene un marcado efecto en las propiedades físicas de los polímeros. Un ejemplo lo constituyen algunos polisacáridos obtenidos de *E. coli* y *Zooglea ramigera* cuya secuencia monomérica está constituida por D-glucosa y D-galactosa únicamente. La naturaleza aniónica de estos polímeros, se debe a los grupos laterales de ácido pirúvico que se encuentran unidos a la galactosa (Anderson *et al.*, 1987).

Tabla IV. EJEMPLOS DE LA ESTRUCTURA DE POLISACARIDOS MICROBIANOS (Pace, 1987)

Polisacárido	Microorganismo	Tipo de polímero	Monómeros	Enlaces
Dextranas	<i>Leuconostoc</i>	Corto-ramificado	Glucopiranososa	α 1-6 C. P. α 1-3 C. L.
Escleroglucano	<i>Sclerotium</i>	Corto-ramificado	Glucopiranososa	β 1-3 C. P. β 1-6 C. L.
Putulana	<i>Aureobasidium</i>	Bloque lineal	Glucopiranososa	α 1-4 Trímero β 1-6Tetrá- mero
Alginato	<i>Azotobacter</i>	Bloque lineal	Ac. manurónico Ac. gulurónico	β 1-4 α 1-4
Xantana	<i>Xanthomonas</i>	Esqueleto lineal con ramificaciones de unidades de trímeros alternados	Glucosa (cadena) Ramificaciones: acetil-D-manosa Ac. glucurónico D-manosa-4,6- piruvato	β 1-4 cadena α 1-3 β 1-2 β 1

CP. = Cadena Principal C. L. = Cadena Lateral

Biosíntesis de polisacáridos microbianos.

Se han distinguido dos mecanismos de síntesis de exopolisacáridos (Sutherland, 1977). Uno de ellos se presenta principalmente en cocos gram-positivos e involucra la participación de transferasas extracelulares, las cuales sintetizan homopolisacáridos como las dextranas y las levanas a partir de sacarosa. Un segundo mecanismo implica la participación de un tren de enzimas intracelulares que sintetizan el polímero a partir de azúcares activados. Posteriormente, el polisacárido sufre una serie de transformaciones y es exportado hacia el medio extracelular.

El segundo mecanismo de síntesis es un proceso en el cual hay una fuerte demanda de energía que representa una proporción significativa del total de energía contenida en la célula. Se ha estimado que en la biosíntesis de xantana se necesitan 11 moles de ATP para la formación de cada unidad repetitiva de pentasacárido. Por otro lado, en el caso de los alginatos, se calculó que por cada residuo de ácido urónico en la cadena polimérica se requieren 3 moles de ATP (Jarman y Pace,1984).

En forma generalizada, las rutas de biosíntesis de estos compuestos están constituidas por las siguientes etapas:

- a) síntesis o transporte intracelular de los sillares estructurales en la forma de ésteres de azúcares 1-fosfato.
- b) activación de esos compuestos por nucleótidos trifosfatados para formar azúcares nucleotídicos difosfatados.
- c) cuando sea requerido, modificación de los azúcares nucleotídicos difosfatados a otros derivados tales como azúcares ácidos activados.
- d) unión a un acarreador lipídico isoprenoide de cadena larga para formar la estructura base del polímero. Este acarreador lipídico isoprenoide también se utiliza en la síntesis de peptidoglucanos y lipopolisacáridos.
- e) modificación por adición de grupos sustituyentes (no azúcares) al polímero.
- f) transporte por medio del acarreador lipídico y liberación al medio externo.

En estas vías metabólicas se requiere de precursores activados de alta energía. Se ha observado que en la mayoría de los polisacáridos se requiere de

UDP-D-glucosa, pero en casos particulares pueden encontrarse otras formas como ADP-D-glucosa que se utiliza en procariontes para la síntesis de glicógeno. Este tipo de compuestos también se requiere para la síntesis de productos de almacenamiento intracelulares, como el glicógeno y el disacárido trehalosa en eucariontes. Cabe mencionar que aún no se tiene pleno conocimiento de los mecanismos que canalizan estos precursores activados para la síntesis de exopolisacáridos, sin embargo, se les considera como un primer paso de control o regulación (Pace, 1987; Sutherland, 1990).

Los azúcares activados no solo sirven como compuestos donadores de energía, también son el único medio por el cual se pueden generar transformaciones de los azúcares monoméricos. Algunos ejemplos de los mecanismos involucrados en tales transformaciones se ilustran en la **Tabla V**. Las reacciones enzimáticas implicadas en estas interconversiones, están reguladas por la concentración intracelular de los azúcares activados. Este paso puede constituir una importante fuente de regulación de la biosíntesis de exopolisacáridos, generalmente la sobreexpresión de estas enzimas conduce a la sobreproducción de los polímeros (Pace, 1987; Sutherland, 1990).

La disponibilidad del acarreador lipídico isoprenoide es un factor limitante para la síntesis de exopolisacáridos ya que la cantidad que se encuentra intracelularmente, se canaliza preferencialmente para la formación de peptidoglucanos y lipopolisacáridos. Consecuentemente, la demanda intracelular de estos lípidos es muy elevada. Se estima que en bacterias, el total

disponible en cada célula es de 5.5×10^4 moléculas, equivalente al 0.02% del peso seco celular. El lípido funcional en procariontes se ha descrito como un C55 isoprenil fosfato (sinónimos: bactoprenil fosfato, undecaprenil fosfato). Este funciona como aceptor de los monómeros en la síntesis de los polímeros (Sutherland, 1990).

Tabla V. INTERCONVERSIONES EN LOS AZUCARES NUCLEOTIDICOS.

MECANISMO	PRODUCTOS
2-Epimerización	UDP-N-acetil-D-manosamina
4-Epimerización	UDP-D-galactosa UDP-D-ac. galacturónico UDP-D-N-acetil-D-galactosamina
Descarboxilación	UDP-D-xilosa
Deshidrogenación	UDP-D-ac. glucurónico GDP-D-ac. manurónico

En *Klebsiella aerogenes* se ha observado la adición secuencial de D-glucosa-1-fosfato y dos moles de D-galactosa a partir de UDP-D-glucosa y UDP-D-galactosa respectivamente. De la misma manera, en la síntesis de xantana por *Xanthomonas campestris* la unidad pentasacárida repetitiva se forma por la adición secuencial al lípido acarreador de D-glucosa-1-fosfato, posteriormente se transfieren D-glucosa, D-manosa y fosfoenolpiruvato y finalmente, se adicionan ácido D-glucurónico, D-manosa y piruvato como cetal, a partir de UDP-D-glucosa, GDP-D-manosa, acetil coA, UDP-D-ácido glucurónico, GDP-D-manosa y fosfoenolpiruvato, respectivamente.

Se ha planteado el posible papel del acarreador isoprenoide como transportador de cadenas poliméricas hacia el espacio periplásmico, de donde deben cruzar la pared celular para ser liberadas al ambiente externo, o en el caso del material capsular, deben unirse a componentes específicos en la superficie celular. Es posible que la transferencia de exopolisacáridos del sitio de síntesis en la membrana interna, sea seguida por la liberación de la cadena en el espacio periplásmico y la transferencia a la membrana externa puede involucrar zonas de fusión entre las membranas interna y externa. Estas zonas de fusión funcionan efectivamente en el transporte de peptidoglucanos y lipopolisacáridos, desde el sitio de síntesis en el interior de la membrana citoplasmática hasta su localización final en el periplasma o en la membrana externa (Sutherland, 1990).

En la biosíntesis de polisacáridos, también ocurren modificaciones posteriores a la formación de la cadena polimérica. Muchos exopolisacáridos pueden ser degradados parcialmente por enzimas extracelulares. Otras modificaciones se llevan a cabo sin reducción del peso molecular, de éstas, algunos ejemplos son las epimerizaciones post-polimerización de residuos D-glucuronosilos a L-iduronosilos en la dermatina y heparina de eucariontes, o la epimerización de ácido D-manurónico a ácido L-gulurónico en la formación de alginatos bacterianos. El grado de epimerización depende de diferentes factores, pero está influenciado fuertemente por las condiciones de cultivo. Otro aspecto importante es que no se conoce el mecanismo preciso que regula el peso molecular. Es probable que dependa de la cepa, así como de las condiciones

de crecimiento y puede variar enormemente. En eucariontes que sintetizan heparina, se ha sugerido que la masa molecular depende de la cantidad intracelular del azúcar nucleotídico precursor (Sutherland, 1990).

A pesar de todos los estudios realizados sobre la fisiología de síntesis de exopolisacáridos, no se han esclarecido totalmente los mecanismos precisos que regulan o controlan estas rutas metabólicas. Algunos estudios relacionan la sobreproducción de polisacáridos con las condiciones de crecimiento celular, algunos otros, describen la sobreexpresión de una enzima de la vía biosintética que provoca una mayor producción del polímero.

Polisacáridos comerciales.

Algunos factores que han hecho atractivos a los polisacáridos como objeto de un intenso trabajo de investigación, son los siguientes: a) constituyen una familia de compuestos con gran diversidad de propiedades y por lo tanto de gran versatilidad; b) se puede modificar su estructura química y molecular, consecuentemente sus propiedades pueden alterarse de diversas maneras, ya sea por medio de reacciones químicas, o transformaciones catalizadas enzimáticamente y c) su obtención a partir de fuentes renovables.

Se requiere de mas trabajo de investigación acerca de la relación estructura/función de polisacáridos, así como para una mejor comprensión de la actividad biológica de estos compuestos (Bemiller,1989). Es muy notorio el gran

esfuerzo de investigación y desarrollo que se lleva a cabo en la producción de nuevos polisacáridos, principalmente por parte de las compañías productoras e instancias universitarias. En la Tabla VI se enlistan algunos ejemplos de polisacáridos de la nueva generación cuyo desarrollo se ha favorecido mediante el uso de procesos biotecnológicos.

Algunas de las nuevas aplicaciones de polisacáridos se han dado en la industria farmacéutica (Yalpani y Sandford, 1987). Una área importante es el desarrollo de vacunas, donde se utilizan conjugados de polisacáridos capsulares bacterianos con proteínas acarreadoras utilizados como vacunas humanas contra infecciones bacterianas. Otro aspecto es el desarrollo de polisacáridos terapéuticos en la prevención y diagnóstico del SIDA, el ejemplo es un polisacárido derivado de algas marinas reportado como un potente inhibidor del virus del SIDA, este polímero interfiere en la replicación viral.

Se han reportado otros exopolisacáridos con actividad anticancerígena y algunos otros con actividad antitrombogénica. Por otro lado, una área muy interesante es el desarrollo de biosurfactantes, como el Emulsan obtenido de *Acetobacter calcoaceticus* el cual es muy efectivo en la estabilización de emulsiones. No obstante que estas aplicaciones son muy puntuales, reflejan el estado en que se encuentra el trabajo de investigación y la importancia de estos biopolímeros en diversas industrias.

Tabla VI. NUEVOS POLISACARIDOS COMERCIALES (Yalpani y Sandford,1987)

POLISACARIDOS	APLICACIONES
PRODUCTOS DE CELULOSA	
<p>Polímeros líquidos cristalinos Derivados de celulosa: acetato, triacetato, hidroxipropil, tricarbnilato y nitro</p>	<p>Productos especiales en ingeniería de plásticos.</p>
<p>Productos de liberación controlada Hidroxipropil celulosa Hidroxipropil metil celulosa Celulosa pulverizada</p>	<p>Liberación controlada de fármacos. Cosméticos.</p>
<p>Productos espesantes y recubridores Carboximetilcelulosa de bajo PM Hidroxietil celulosa</p>	<p>Recubrimientos. Espesantes en pinturas.</p>
<p>Superabsorbentes Celulosa y gomas naturales Goma guar + boratos Carboximetilhidroximetil-goma guar Hidroxietil quitina Goma xantana Derivados de alginatos</p>	<p>Salud y productos agrícolas.</p>
<p>Aditivos en Alimentos Celulosa microfibrilada Quitina/Quitosano</p>	<p>Suspensiones y emulsiones estables.</p>
PRODUCTOS DE ALMIDON	
<p>Surfactantes Polioles derivados de almidón</p>	<p>Surfactantes e industria de espuma de poliuretano</p>
<p>Aditivos en plásticos y nuevos polímeros Formulaciones de almidón-glicerol-polivinil-alcohol</p>	<p>Bolsas de plástico de lavandería para hospitales</p>
<p>Derivados de almidón de maíz</p>	<p>Películas de plástico biodegradable</p>
<p>Formulaciones de almidón-polietileno-ácido co-acrílico</p>	<p>Preparación de membranas semipermeables</p>

TABLA VI CONTINUACION...

Producción de polihidroxibutirato

Propiedades similares al poli-
propileno, botellas bio-
degradables, cosméticos

OTROS PRODUCTOS DE POLISACARIDOS

Acido hialurónico

Humectante excelente,
lubricante, cirugía oftálmica,
lociones rejuvenecedoras de
la piel, farmacéuticos

Alginatos

Alginato de calcio

Preparación de geles fuertes,
tratamiento de heridas,
Productos altamente adsor-
bentes y hemostáticos

Quitina/Quitosano

Acelerador en el saneamiento
de heridas, humectante de
piel, floculante catiónico en
tratamiento de agua,
nematocida

Oligosacáridos

Dextrinas derivadas de almidón,
Oligosacáridos derivados de
quitina, dextrana y pululana

Edulcorantes bajos en calorías
Aditivos en alimentos,
Preparación de antibióticos,
anticuerpos, vacunas y
antígenos

En la situación actual, los exopolisacáridos de aplicación en la industria farmacéutica se producen como compuestos químicos finos, cuyo volumen de producción es bajo; por otro lado, los polisacáridos microbianos de aplicación en industrias como la alimentaria, papelera y otras, se requieren en grandes cantidades y el control de calidad puede ser menos riguroso. En este grupo se encuentran los alginatos, en cuya producción los procesos biotecnológicos constituyen una herramienta importante.

ASPECTOS GENERALES DE ALGINATOS

Algunas especies de bacterias gram-negativas producen polisacáridos extracelulares similares en composición química y tipo de enlace a los alginatos de algas marinas. La diferencia estructural importante es la presencia de grupos O-acetilos asociados con los residuos D-manuronosilos de los alginatos bacterianos. Los grupos acetatos sustituyentes tienen un efecto marcado sobre la capacidad de atrapamiento de iones, además de un ligero efecto sobre la viscosidad de las soluciones de estos productos.

Por otra parte, la capacidad de producción de alginatos bacterianos es función de la cepa usada. En algunas bacterias las cantidades de exopolisacárido producidas son muy elevadas, mientras que en otras los rendimientos son muy bajos. De esta manera, la factibilidad de producción del producto bacteriano depende directamente de la eficiencia de los microorganismos productores para convertir el sustrato en polisacárido, así como de los costos asociados al proceso de fermentación y de recuperación del producto. Es necesario considerar que existen barreras de reglamentación para el uso de productos bacterianos, principalmente si se obtienen de cepas patógenas, por lo que es necesario seleccionar una fuente microbiana preferentemente aceptada y reconocida como segura. De igual manera, debe asegurarse que el producto sea libre de toxicidad, carcinogenicidad, etc. Bajo estas consideraciones, las aplicaciones potenciales de los alginatos bacterianos podrían repercutir más rápidamente en sectores industriales no alimentarios, mientras que las

aplicaciones en la industria alimentaria requerirán de plazos mayores. Por estas diferencias, los alginatos bacterianos no han llegado a constituirse como una alternativa económicamente viable en relación a los productos de algas. Sin embargo, esta situación puede cambiar en la medida en que se logre desarrollar procesos de fermentación con mayores rendimientos, así como cepas bacterianas estables en la producción del polímero.

Estructura y propiedades de los alginatos.

Los alginatos son copolímeros lineales del β -D-ácido manurónico y su C-5 epímero, el α -L-ácido gulurónico, unidos mediante enlaces (1-4). Estos residuos de ácidos urónicos están arreglados en las cadenas como bloques homopoliméricos de ácido manurónico o ácido gulurónico intercalados con secuencias en las que ambos residuos están alternados (figura 1). Los alginatos de *A. vinelandii* exhiben las propiedades físicas que muestran los alginatos de algas. Los polímeros de otras especies resultan un tanto diferentes ya que presentan un menor peso molecular y son mas polidispersos. El material producido por *Pseudomonas* no presenta las regiones prolongadas de ácido gulurónico que son responsables de las propiedades gelificantes catión-inducidas de los alginatos (Skjak-Bræk *et al.*, 1986; Singh *et al.*, 1987). A diferencia de los alginatos obtenidos de algas marinas, los alginatos bacterianos presentan un alto grado de acetilación. Los grupos acetilos siempre se encuentran asociados a los residuos D-manurosilos. El grado de sustitución depende de la proporción de ácido manurónico en la molécula del alginato.

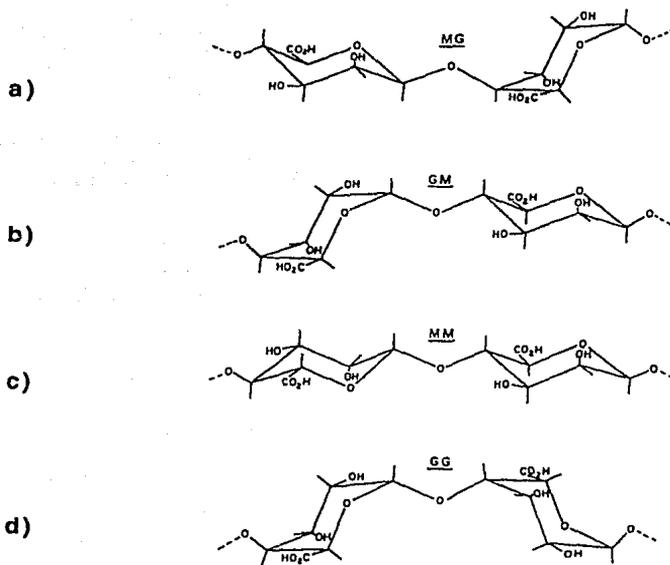


Figura 1.
Arreglo estructural de la molécula de alginatos (Brant, 1991)
 a) y b) Bloques constituidos por ácido manurónico y ácido gulurónico alternados.
 c) y d) Bloques homopollméricos.

Está bien establecido que los alginatos como muchos otros polisacáridos son una familia de moléculas polidispersas con respecto a su composición y a su peso molecular (Larsen y Haug, 1971; Pindar y Bucke, 1975; Skjak-Bræk *et al.*, 1986). En la Tabla VII se presentan algunos ejemplos de la composición de alginatos de diferentes microorganismos.

Tabla VII. COMPOSICION DE ALGINATOS (Sutherland, 1990).

Origen	Man:Gul	Acetillos	2,3 Diacetilos	Bloques Gul.
Algal	Muy variable	0	0	+
<i>A. vinelandii</i>	Muy variable	21-50%	3-11%	+
<i>P. aeruginosa</i>	1 : 0	37-57%	5-19%	-
<i>P. putida</i>	0.6 : 0.4	3-4%	ND	-
<i>P. phaseolicola</i>	0.95 : 0.05	1%	?	-
<i>P. pisi</i>	0.83 : 0.17	4.5%	ND	ND

ND= No determinado

La distribución de los dos monómeros (gulurosilos y manurosilos) a lo largo de la cadena polimérica, influye fuertemente sobre la propiedad de selectividad para atrapar iones: los alginatos con alto contenido en residuos guluronosilos presentan alta afinidad para iones metálicos divalentes. En estos polímeros se presenta un mecanismo de cooperatividad para quelar iones calcio entre los residuos gulurosilos contiguos en una o varias cadenas, provocando una marcada histéresis. El fenómeno es debido a la formación de anillos que contienen iones enlazando diferentes cadenas poliméricas muy estables a la

disociación. De esta manera se forma un gel cuya conformación se ha llamado "modelo de la caja de huevos" por la forma del enlace (figura 2).

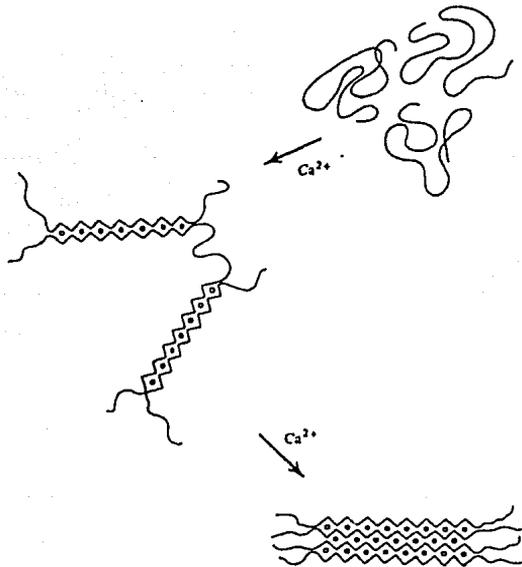


Figura 2.

Modelo de la "caja de huevos" de las zonas de unión del alginato. El entrecruzamiento involucra la asociación lateral de secuencias de ácido gulurónico, los cuales forman cavidades electronegativas que son ocupadas por los iones calcio en la estructura del gel.

Organismos que producen alginatos.

Los alginatos se extraen comercialmente de las paredes celulares de algas cafés (Phaeophyceae). Las especies explotables se enlistan en la **tabla VIII**. De éstas, las mas importantes pertenecen a los géneros *Ascophyllum*, *Laminaria* y *Macrocystis*. De los cuerpos fructíferos de *Ascophyllum nodosum* se puede extraer alginatos que contienen solo alrededor del 15% de residuos gulurosilos, en cambio, el polímero que se encuentra en el tejido mas viejo puede contener mas del 40% de estos resíduos presentes principalmente en forma alternada. Los estípites de *Laminaria hiperborea* son una fuente de alginatos con alto contenido de gulurósidos (mas del 65%) presentes predominantemente en forma de bloques. Esta variabilidad ocasionó que los alginatos de aplicaciones específicas sean obtenidos a partir de especies selectas de algas. La dependencia de fuentes naturales sujetas a condiciones ambientales cambiantes, puede generar problemas en el costo y suministro del material. Sin embargo, el aspecto mas relevante es la baja uniformidad en la composición química de los polímeros (Haug y Larsen, 1971; Morris, 1987).

Como se describe en la **tabla VIII**, un importante número de especies de bacterias gram-negativas producen un cierto tipo de alginato. Solo *Azotobacter vinelandii* produce un polímero muy semejante al proveniente de algas sobre todo con relación a la presencia y longitud de los bloques de ácido gulurónico. Aunque en esta especie solo se produce alginato como único polisacárido extracelular, el sustrato también puede dirigirse a la formación de ácido poli-hidroxi-butírico, que es un polisacárido intracelular de reserva. *Azotobacter*

chroococcum sintetiza dos exopolisacáridos, uno de ellos es alginato con alto contenido de ácido manurónico. Las especies de *Pseudomonas* producen alginato con alto contenido de manurosilos distribuidos al azar y no presenta la estructura en bloques de los alginatos provenientes de algas o de *A. vinelandii*.

Tabla VIII. ORGANISMOS REPORTADOS CON CAPACIDAD DE PRODUCCION DE ALGINATOS (Sandford y Balrd, 1983).

ALGAS MARINAS

Ascophyllum nodosum
Laminaria digitata
Laminaria hyperborea
Macrocystis pyrifera
Dictyosiphon foeniculaceus
Durvillaea spp
Eisenia bicyclis

BACTERIAS

Azotobacter vinelandii
Azotobacter chroococcum
Azotobacter beijerinckii
Pseudomonas aeruginosa
Pseudomonas cepacia
Pseudomonas fluorescens
Pseudomonas mendocina

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno oportunista de las vías respiratorias en humanos que no sintetiza exopolisacárido cuando se encuentra en forma libre. Este aspecto ha generado la necesidad de comprender la bioquímica y regulación de la síntesis de alginato en esta especie con el fin de identificar compuestos no tóxicos que puedan interferir efectivamente con la síntesis de este polímero (May *et. al.*, 1991).

Biosíntesis de alginato.

Pindar y Bucke (1975) determinaron la secuencia de reacciones enzimáticas que involucra la biosíntesis de alginato a partir de sacarosa en *A. vinelandii* NCIB 9068. Esto lo llevaron a cabo por medio de la alimentación de intermediarios radiactivos a extractos libres de células y estudiando las enzimas individualmente. Sin embargo, no determinaron la etapa en que se introducen los grupos acetilo o su asociación con el ácido manurónico o gulurónico. Posteriormente, Davidson *et al.*, (1977) demostraron que los grupos acetilo estaban asociados únicamente con los residuos de ácido manurónico.

En la figura 3 se presenta la ruta biosintética propuesta para la formación del alginato bacteriano. Se ha sugerido (Haug y Larsen, 1971) que el alginato se sintetiza inicialmente como homopolímero por un mecanismo similar al empleado en la síntesis de otros exopolisacáridos. Los residuos de ácido manurónico se unen consecutivamente al acarreador lipídico isoprenoide y en este nivel, también se adicionan los residuos acetilos. Una vez que se forma el polímero, éste se excreta de la célula como un ácido poli-D-manurónico acetilado. Una vez excretado se epimeriza por medio de la C-5 epimerasa extracelular. Esta epimerasa requiere iones calcio para su actividad y realiza el intercambio del H5 del residuo manurosilo con el agua. Es importante resaltar que la concentración de iones calcio influye en el patrón de epimerización: a concentraciones moderadas (0.9 mM) el patrón de reacción de la epimerasa de *A. vinelandii* favorece la introducción de residuos L-gulurosilos vecinales, promoviendo así, la formación de secuencias largas de ácido gulurónico.

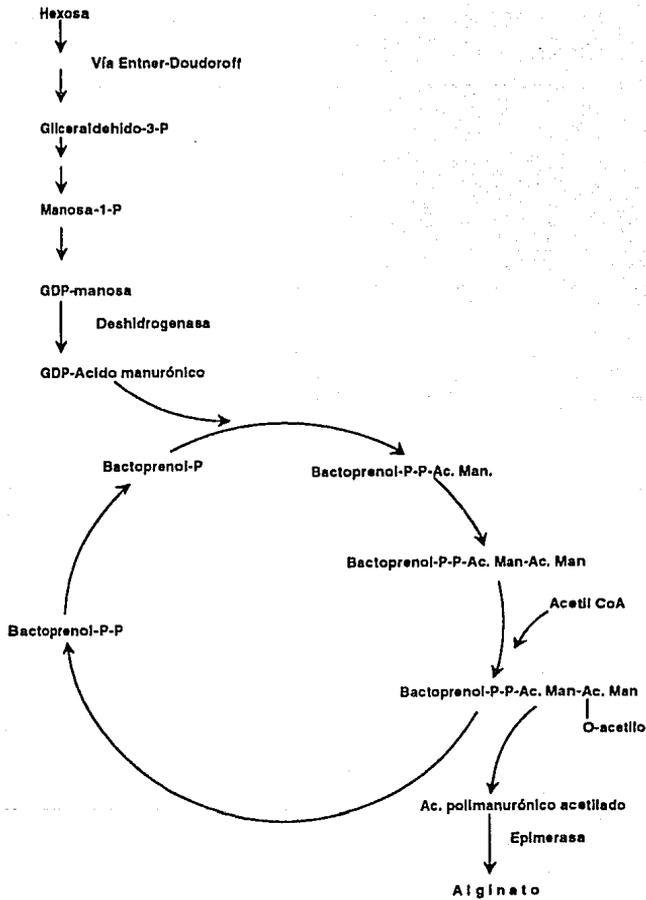


Figura 3. Posible vía biosintética de alginatos bacterianos (Sutherland, 1990)

En la presencia de altas concentraciones de iones calcio, la epimerasa tiende a introducir residuos guluronosilos únicos, para formar alginatos con un contenido alto de secuencias alternadas. Existen diferencias de especificidad de esta enzima dependiendo de la especie bacteriana. Como se ha mencionado, solo *A. vinelandii* produce un alginato con unidades consecutivas de ácido gulurónico, por lo que se ha sugerido que las rutas biosintéticas puedan ser diferentes dependiendo de la especie productora (Larsen y Haug, 1971; Singh *et al.*, 1987; Annison y Coperwhite, 1984; Brivonese y Sutherland, 1989).

La actividad de la epimerasa también se afecta por la presencia de grupos O-acetilos en el ácido poli-D-manurónico. Una hipótesis es que esos grupos sustituyentes presentan un efecto de protección de los residuos manurosilos contra la actividad enzimática. De esta manera, el grado de epimerización depende de diferentes factores, los cuales incluyen: el grado de acetilación, la concentración de calcio, así como la especie de bacteria involucrada (Skjak-Bræk *et al.*, 1986). Es interesante resaltar que en la síntesis de la heparina, el grado de O-sulfatación de los residuos iduronosilos o D-glucosaminilos también limita la 5-epimerización y puede también considerarse como resultado de un efecto de protección (Sutherland, 1990).

Los mecanismos de control de esta vía biosintética son muy complejos, debido entre otras causas, a que los precursores y algunas enzimas son comunes para la síntesis de exopolisacáridos, de lipopolisacáridos y de peptidoglucanos.

Todos estos compuestos se sintetizan en el citoplasma, a nivel de la membrana interna (Sutherland, 1977). Se ha observado que la tasa de biosíntesis de alginato está controlada por la activación de las enzimas clave: la fosfomanosa isomerasa, la GDP manosa pirofosforilasa y la GDP manosa deshidrogenasa (Horan *et al.*, 1981). Es muy notoria la falta de referencias en la literatura en relación con los mecanismos de transporte y liberación al medio exterior de los alginatos, etapas limitantes en la síntesis de otros exopolisacáridos.

Fisiología de síntesis de alginatos.

A. vinelandii produce alginatos bajo diversas condiciones de fermentación. Los valores de pH que generalmente han sido utilizados para la máxima producción del polímero se encuentran entre 7.0 y 7.3. La incubación se lleva a cabo en un intervalo de temperatura entre 30 y 32°C. En cultivos en lote bajo limitación de fosfatos, *A. vinelandii* sintetiza alginato durante la fase de crecimiento y la síntesis termina cuando las células entran a la fase estacionaria. Por otro lado, en cultivo continuo bajo limitación de fosfatos, la tasa de síntesis de alginato es independiente de la velocidad de crecimiento (Deavin *et al.*, 1977; Okabe, *et al.*, 1981; Horan *et al.*, 1981).

La composición del medio de cultivo juega un papel muy importante. *A. vinelandii* puede crecer y producir alginato utilizando diferentes fuentes de carbono (glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa, manitol, rafinosa y glicerol). La mayor producción de alginato se obtiene cuando se utiliza sacarosa, mientras que con glucosa, maltosa y fructosa se obtienen menores rendimientos (Okabe,

et al., 1981; Horan *et al.*, 1981). En el caso de especies como *Pseudomonas syringae* se presenta una situación diferente, si el sustrato es sacarosa, se produce levana, mientras que si el sustrato es glucosa, el producto es alginato.

Un medio de cultivo con una relación alta de carbono/nitrógeno, es una condición que promueve la síntesis de alginato (Sutherland, 1977). La producción de polihidroxitirato es mayor en cultivos limitados de oxígeno y llega a constituir más del 70% del peso seco celular en ciertas cepas del género *Azotobacter* (Stephenson *et al.*, 1978). Tanto la acumulación del polihidroxitirato (Stevenson y Socolofsky, 1966) como la secreción del alginato (Page y Sadoff, 1975) están asociadas con el proceso de enquistamiento, el cual genera células esféricas de latencia y de resistencia a la desecación (quistes). Así, puede ser difícil separar la síntesis de estos polímeros, el menos cuando se utilizan cepas silvestres (Brivonese y Sutherland, 1989).

Azotobacter es un aerobio obligado. Los carbohidratos se metabolizan mediante la vía Entner-Doudoroff, el ciclo de las pentosas y el ciclo del ácido tricarbóxico, siendo oxidados finalmente a bióxido de carbono. Los productos del metabolismo son esencialmente alginato, células, CO₂ y polihidroxitirato. En cultivos con una elevada tensión de oxígeno, esta bacteria presenta altas velocidades de respiración afectando la producción de alginato, debido a que el sustrato se dirige principalmente a la formación de células y CO₂. Por ello, es necesario controlar la tasa de respiración durante la

fermentación, hecho que resulta muy difícil de lograr en un cultivo en lote donde la biomasa y demanda de oxígeno cambian constantemente y hacen del cultivo continuo un sistema de producción ventajoso (Deavin *et al.*, 1977).

En fermentaciones a nivel de matraz, Brivonese y Sutherland (1989) observaron un aumento en la producción de alginato cuando aumentaron la agitación de 120 a 280 rpm en un medio de cultivo rico en nitrógeno y fosfatos. En estas condiciones, la secreción de polisacárido fue mayor que en condiciones de fijación de nitrógeno. En cultivo continuo, Horan *et al.*, (1981) observaron una disminución en la producción de alginato en un medio con exceso de fosfatos. La limitación de estos iones causó un incremento en la producción de polímero. Sin embargo, Brivonese y Sutherland (1989) observaron mayor producción de alginato en un medio rico en fosfatos. En este mismo estudio, observaron que la síntesis de polímero continuó después de que cesó el crecimiento celular, este comportamiento también fue reportado por Horan *et al.*, (1981). En contraparte, Deavin *et al.*, (1977) reportaron la síntesis de alginato paralelamente al crecimiento microbiano. Estos resultados aparentemente contradictorios, reflejan el hecho de que las cepas usadas en el laboratorio se seleccionan únicamente en base a su producción de alginato. Es decir, que el mismo fenotipo puede reflejar la expresión de una o mas mutaciones diferentes.

Principales usos de los alginatos

Las principales aplicaciones industriales de los alginatos están determinadas por su peso molecular y su composición química. Las soluciones acuosas de

estos polímeros pueden ser usadas como agentes espesantes, como estabilizantes de espumas y emulsiones, así como en suspensiones de partículas sólidas. Las aplicaciones típicas de alginatos se enlistan en la **tabla IX**. Estos polisacáridos también se han adicionado en alimentos para mejorar la retención de agua y para inhibir la cristalización del agua, con lo cual se proporciona estabilidad en el proceso de congelación-descongelación de alimentos. Se ha sugerido que el éster formado de alginato y propilenglicol es uno de los pocos polisacáridos que funcionan como un emulsificante auténtico (Morris, 1987). Una aplicación importante de los geles de alginato ha sido en la inmovilización de componentes celulares o células completas para la preparación de biocatalizadores. Para ello, es importante su capacidad de gelificación a temperatura ambiente en presencia de iones calcio.

Tabla IX. ALGUNAS APLICACIONES DE LOS ALGINATOS (Margaritis, 1985)

APLICACIONES DE ALGINATOS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA:

Agentes Gelificantes

Rellenos para pastelería
Postres de leche
Postres de gelatina
Alimentos para animales

Agentes Espesantes y Estabilizantes

Estabilización de emulsiones en salsas, cremas y aderezos
Estabilización de espumas en cervezas
Espesantes de salsas y rellenos
Suspensión de partículas en jugos y bebidas

Agentes de retención de agua

Estabilidad de alimentos congelados
Mejoramiento de la solubilidad de mezclas secas

APLICACIONES DE ALGINATOS EN OTRAS INDUSTRIAS:

Agentes gelificantes

Geles refrescantes de aire
Impresiones usadas por los dentistas
Preparaciones farmacéuticas

Agentes espesantes y estabilizantes

Estabilidad de emulsiones en pinturas y esmaltes
Espesantes de lociones y detergentes líquidos
Estabilización de espuma en detergentes

OTROS USOS:

Tratamiento de aguas, como floculantes de impurezas
Soporte en biocatalizadores

V) MATERIALES Y METODOS

MICROORGANISMO

El microorganismo utilizado en este trabajo fue una cepa de *Azotobacter vinelandii* ATCC-9046.

MEDIO DE CULTIVO

El microorganismo se creció en medio Burk (MB), considerado como medio base en la realización del presente trabajo. El medio Burk contiene por litro:

K_2HPO_4	0.66g
KH_2PO_4	0.16g
Sacarosa	20.0g.
MOPS	1.42g
$CaSO_4 \cdot 2H_2O$	0.05g
NaCl	0.2g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2g
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.0029g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.027g

PREPARACION DEL MEDIO: se disuelven las sales de potasio, la sacarosa y el MOPS en 600 mL de agua destilada; el sulfato de calcio en 200 mL de agua destilada y las sales restantes en 200 mL de agua destilada. Estas tres fracciones se esterilizan por separado a 121°C y 15 minutos, para evitar precipitaciones en el autoclave. Las fracciones estériles se mezclan bajo campana de flujo laminar.

MANTENIMIENTO DE LA CEPA

La preservación a largo plazo de la cepa, se realizó por liofilización de la misma utilizando leche semidescremada como soporte de liofilización. Para la preservación a mediano plazo, la cepa se almacenó en suspensiones de glicerol al 30%, preparadas de la siguiente manera: se resuspendieron en 35 mL de MB líquido las células crecidas 24 h en MB solidificado con agar al 2%. A este volumen se adicionaron 15 mL de glicerol estéril, se agitó vigorosamente para después repartir 1.2 mL en tubos eppendorf, los cuales se conservaron en congelación (temperatura de -15 a -20°C).

AISLAMIENTO DE COLONIAS

Partiendo de un cultivo en placa de MB incubado a 29°C por 24 h, se resuspendieron células en 5 mL de agua destilada estéril con Tween 80 al 0.7% agitando vigorosamente en vórtex. Se sembró nuevamente en placa de MB tomando 20 µL de la suspensión de células. En estas placas se obtuvieron las colonias separadas.

PREPARACION DE INOCULOS

INOCULACION DE MATRACES DE 250 mL: Partiendo de una colonia aislada se sembró en placas de medio MB sólido con asa de siembra microbiológica. Después de 72 h de incubación se tomaron dos asadas para sembrar en cada matraz que contenía 50, 100 o 150 mL de medio.

INOCULACION DE FERMENTADORES DE 2 LITROS: El inóculo consistió de 100 mL de un cultivo crecido durante 24h en MB líquido (pH 7.2, 29°C y 200 rpm),

utilizando una incubadora de agitación (New Brunswick Scientific Co., Inc. Serie 25. New Jersey, USA). Para obtener estos cultivos se siguió el mismo procedimiento de los inóculos para matraces de 250 mL.

FERMENTACIONES

Las fermentaciones a nivel de matraz de 250 mL se llevaron a cabo en una incubadora de agitación. Las condiciones de cultivo fueron pH 7.2, temperatura de 29°C y agitación de 200 rpm, el volumen de medio se varió de acuerdo a cada experimento.

Los cultivos en fermentador de 2 litros se realizaron con un volumen de 1.5 litros de MB enriquecido con extracto de levadura (3 g/L), sin regulación de pH y a temperatura de 29°C. Las velocidades de agitación y aireación se variaron según el experimento. En todas las fermentaciones se controló la formación de espuma con la adición de antiespumante Rhodorsil Silicone 426R. Se utilizó un fermentador Setric Genie Industriel Mod. 7F (Toulouse, Francia) equipado con: un electrodo de pH (Ingold 465 Undorlf, Suecia) y otro de oxígeno disuelto (Ingold 322 Undorlf, Suecia); un impulsor de tipo turbina Rushton de 5 cm de diámetro externo, con 4 paletas (1 x 2.3 cm) separadas 90° una de otra; el impulsor se encuentra colocado a 4 cm del anillo difusor de aire, el cual, a su vez se encuentra a 2.2 cm del fondo de la jarra; 2 mamparas de 3 cm de ancho; el termopozo y el electrodo de oxígeno tienen un diámetro de 2 cm y se encuentran en forma alternada con las mamparas; la jarra tiene fondo circular y mide 12 cm de diámetro interno y 20 cm de altura.

ESTUDIO DE LA COMPOSICION DEL MEDIO DE CULTIVO

La composición final del medio de cultivo se estableció mediante el análisis de cada nutriente en forma individual y la selección de las concentraciones en las que se obtuvo la mayor producción de alginato. Las concentraciones analizadas se describen para cada experimento en RESULTADOS Y DISCUSION. Cada experimento se realizó por duplicado y en cada uno de ellos, el error estándar (cociente entre la varianza y el promedio) siempre fue menor al 10 %.

TECNICAS ANALITICAS

CUANTIFICACION DE CRECIMIENTO MICROBIANO

La medición del crecimiento microbiano se realizó leyendo la D.O. a 540 nm de una muestra de medio de fermentación, en un espectrofotómetro (Milton Roy modelo Spectronic 601. Rochester, NY). En la aplicación de los resultados experimentales a los modelos matemáticos, la D.O. se correlacionó con el peso seco celular en una curva patrón cuya ecuación fue la siguiente:

$$\text{Biomasa} = [\text{Lectura D.O.} (0.163)] - 0.047$$

$$\text{Coeficiente de correlación} = 0.995$$

CUANTIFICACION DE ALGINATO (Jarman *et al.*, 1978)

Se centrifugó una muestra de cultivo (10 mL) a 12 000 rpm por 15 min. Al sobrenadante obtenido se adicionaron 30 mL de isopropanol y se agitó vigorosamente. Después de 10 min, el precipitado obtenido se filtró en papel

Whatman GAT previamente secado y pesado. Se lavó el filtrado con 10 mL de isopropanol-agua (3:1, v:v) y se secó a vacío a 60°C por 24 h en un horno de vacío (Precision Scientific, Inc., Chicago, Illinois). Finalmente se pesó el papel y se calculó la concentración de polisacárido en el medio.

CUANTIFICACION DE SACAROSA EMPLEANDO LA TECNICA DE β -FRUCTO-FURANOSIDASA-DNS

Se preparó una solución (2.5 mg/mL) de la enzima β -fructofuranosidasa (Gist Brocades con una actividad de 243 U/mg a 40°C) en amortiguador de citratos (0.32 M, pH 4.6). Se colocaron muestras de 0.9 mL en tubos de ensaye. Se adicionaron 0.1 mL de solución enzimática a cada tubo, se mezclaron en vórtex y se dejaron reposar por 3 min. Se adicionó 1.0 mL de DNS (ácido 3,5-dinitro salicílico. Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo. EU). Se calentaron los tubos en un baño de agua a ebullición por 5 min. Inmediatamente después se enfriaron en baño de hielo. Se adicionan 10.0 mL de agua a cada tubo. Se mezclaron y leyeron en un espectrofotómetro a 540 nm contra un blanco de agua destilada. El ensayo enzimático solo permite manejar muestras en un rango de concentraciones de 0.1 a 2 g/L de sacarosa, por lo que se realizaron las diluciones necesarias. Se realizaron mediciones por triplicado de cada muestra y el error estándar nunca fue mayor al 10 %.

MEDICION DE VISCOSIDAD

Se midió la viscosidad generada en el medio de cultivo a partir de una muestra directa de la fermentación utilizando un viscosímetro de cono y plato (Wells-

Brookfield modelo LVT, serie 82198. Stoughton, Ma, EU). Este viscosímetro requiere de 1 mL de muestra. El intervalo de velocidades de rotación que puede aplicarse es de 0.3 a 60 rpm, lo cual equivale a gradientes de deformación de 0.6 a 120 s⁻¹ (Corona, 1987). Todas las determinaciones se llevaron a cabo a una velocidad de rotación de 6 rpm (12 s⁻¹), a temperatura ambiente y por duplicado de cada muestra. Cabe mencionar que en el manejo de este viscosímetro la lectura obtenida puede variar dependiendo del ajuste hecho entre el cono y el plato, sin embargo, el error estándar siempre fue menor al 10 %.

VI) RESULTADOS Y DISCUSION

EXPERIMENTOS PRELIMINARES.

En la primera parte del trabajo, se utilizó una cepa sometida a un proceso de mutación con etil metano sulfonato y luz ultravioleta, seleccionada en la Facultad de Química de la UNAM. Esta cepa produjo (a 72 horas de incubación), hasta 6 g/L de polisacárido precipitable con iso-propanol en matraces de 250 mL de medio Burk, el cual no contiene nitrógeno. Esta cepa presentó una gran problemática cuando se llevaron a cabo cultivos a nivel de fermentador de 3 litros. Se observó que esta característica se debió a la inestabilidad de la cepa para producir el polisacárido en relación al número de generaciones. Realizando fermentaciones consecutivas, se observó que su capacidad de producción se redujo al 50 % a la segunda fermentación, reduciéndose hasta al 8.5 % en una tercera fermentación. Se logró mantener estable dicha producción cuando se sometió la cepa a cultivos consecutivos en presencia de neomicina a una concentración de 15 µg/L.

Se estudió el efecto de diferentes componentes del medio de cultivo sobre la producción del polímero. Manteniendo las mejores condiciones, se logró producir rutinariamente hasta 4.0 g/L de polisacárido. En estas condiciones se iniciaron fermentaciones en fermentador de 2 litros. Sin embargo, en estudios sobre el patrón de digestión del ADN de la cepa, se encontró una mezcla de material genético proveniente de un cultivo mixto de *A. vinelandii* y otra cepa identificada posteriormente como *Rhizobium* sp. Se procedió entonces a aislar

una cepa a partir de la cepa silvestre ATCC 9046 (denominada WTC13) y otras a partir del cultivo mixto (denominada C15). En ambos casos se analizó el patrón de digestión del ADN para verificar que se trataba de *A. vinelandii*.

COMPARACION DE LA PRODUCCION DE ALGINATOS POR LAS CEPAS C15 Y WTC13 DE *Azotobacter vinelandii*

Debido a que la cepa de *A. vinelandii* 9046-F que se había venido utilizando era un cultivo mixto entre *Azotobacter* y *Rhizobium* y como éste último también tenía la capacidad de producir un polisacárido que precipita con iso-propanol, se decidió abandonar el trabajo realizado con esa cepa y obtener cultivos puros de *A. vinelandii* tanto derivados de la cepa silvestre (WTC13) como de la cepa 9046-F (C15). Inicialmente estas cepas se seleccionaron mediante resiembras en placas de medio Burk. Posteriormente, se realizaron fermentaciones a fin de comparar la producción de alginato de ambas cepas utilizando matraces Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 150 mL de medio Burk.

Estos resultados se presentan en la figura 4 . Si bien la diferencia entre las dos cepas es relativamente pequeña, se seleccionó la cepa WTC13 dado que proviene de una cepa de colección y presenta por unidad de sacarosa consumida, mayor producción de alginato y células. Con la cepa WTC13 se produjeron 1.25 g/L de alginato a las 72 h de incubación. El rendimiento en base a la sacarosa consumida fue de 0.343 (g de alginato/g de sacarosa consumida). La cepa C15 produjo 0.9 g/L de alginato y el rendimiento obtenido fue de 0.117 (g de alginato/ g de sacarosa consumida).

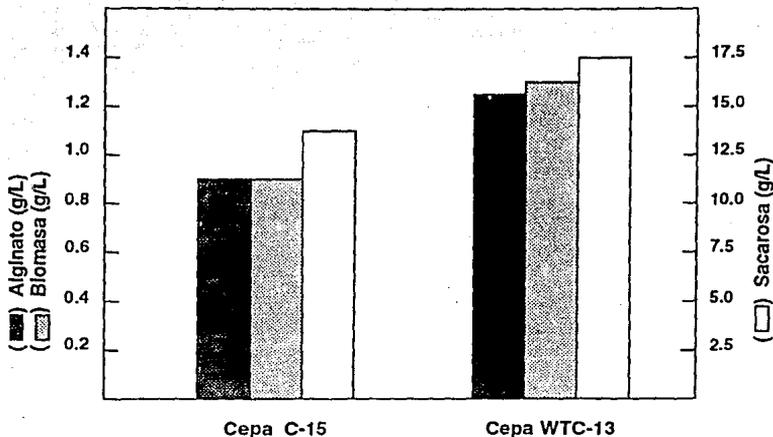


Figura 4.
Comparación de la producción de alginato entre las cepas de *Azotobacter vinelandii* C15 y WTC13, crecidas en matraces de 250 mL con 150 mL de medio Burk sin fuente de nitrógeno.

Es común encontrar en la bibliografía al respecto, producciones de alginato en un intervalo de 0.8 a 1.5 g/L, utilizando cepas seleccionadas y medios de cultivo no optimizados (Okabe *et al.*, 1981; Annison y Couperwhite, 1984; Brivonese y Sutherland, 1989). En estos trabajos, se logró incrementar la producción hasta 4 veces más, al optimizar las condiciones y composición del medio de cultivo. Con base en ello, se inició el estudio del medio y las condiciones de cultivo que permitieran la mayor producción de alginato a nivel de matraces de 250 mL utilizando la cepa seleccionada (WTC13). Posteriormente, se realizaron cultivos en fermentador de dos litros.

EFFECTO DE LA CONCENTRACION INICIAL DE IONES FOSFATO

Un aspecto importante fue conocer el efecto de la concentración de iones fosfato, ya que los datos que existen en bibliografía son contradictorios. *Jarman et al.*, (1978) reportaron una mayor producción de alginatos en un medio de cultivo limitado de fosfatos. En cambio, *Brivonese y Sutherland*, (1989) obtuvieron la mayor producción en un medio rico en estos iones. Por otro lado, se pretendía analizar la posibilidad de sustituir el amortiguador MOPS (de baja disponibilidad y alto costo) por un amortiguador de fosfatos. Esto implica manejar una concentración mas alta de fosfatos que permita amortiguar el cambio de pH que ocurre durante la fermentación. Se estudió un rango de concentraciones iniciales de 2.5 a 200 mM. Los resultados se muestran en la **figura 5**, en donde se observa que la mayor producción de alginato se obtuvo en las concentraciones mas bajas que se emplearon (2.5 y 5.0 mM). En este experimento se observó una fuerte inhibición en la síntesis del polímero a 200 mM de fosfatos, lo cual dificulta la sustitución del amortiguador MOPS por este buffer, ya que la capacidad amortiguadora a 0.2 M es insuficiente para un proceso de esta naturaleza.

Las diferencias en la concentración de alginato no fueron muy marcadas en los niveles de 2.5, 5.0 y 10 mM de fosfatos. En cambio, se observó un fuerte efecto sobre las propiedades de viscosidad del polímero obtenido. Es probable que estos iones tengan mayor influencia sobre la enzima C-5-epimerasa y en menor grado influyan sobre el conjunto de enzimas que sintetizan el alginato.

Brivonese y Sutherland, (1989) sugirieron que las altas concentraciones de fosfatos tienen un papel de amortiguación de los cambios de pH, mas que donadores de energía en forma de ATP.

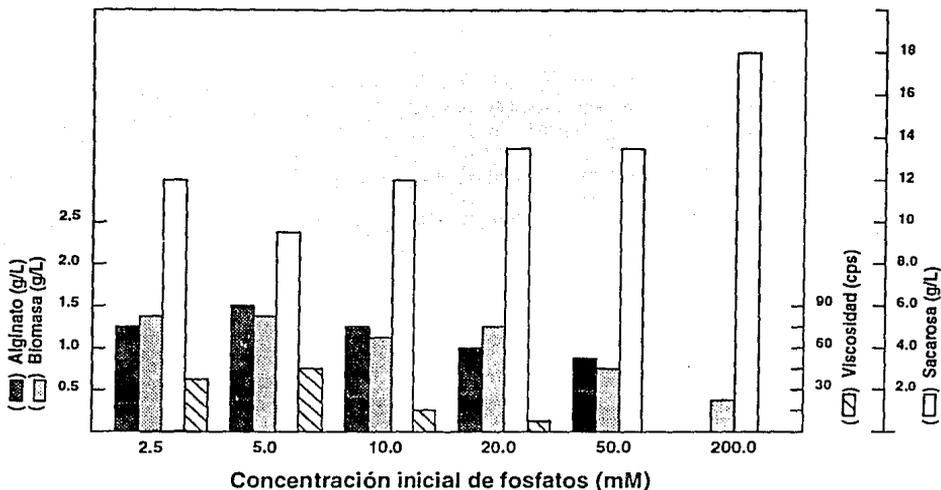


Figura 5. Efecto de la concentración inicial de fosfatos en el medio de cultivo, sobre el crecimiento y producción de alginato por la cepa *A. vinelandii* WTC13, utilizando 150 mL de medio Burk en matraces de 250 mL, en un tiempo de incubación de 72 h.

ADICION DE UNA FUENTE DE NITROGENO AL MEDIO DE CULTIVO.

Azotobacter vinelandii produce alginato en condiciones de fijación de nitrógeno como elemento de defensa a las condiciones ambientales. A diferencia de otros microorganismos fijadores de nitrógeno, su sistema enzimático de nitrogenasa no se inhibe por oxígeno, por lo que la justificación de una producción de polisacárido para disminuir el oxígeno en el

microambiente no es válida. Por otro lado, dado que la sacarosa no se consumió en mas del 50 % en los experimentos anteriores, se pensó en estudiar el efecto de adicionar una fuente de nitrógeno al medio de cultivo.

Se realizó un estudio de la producción de alginato en medio Burk enriquecido con una fuente de nitrógeno comparando contra un control (Cont) de medio Burk. Se analizaron diferentes fuentes de nitrógeno inorgánico tales como: acetato de amonio (Ace), cloruro de amonio (Clo) y sulfato de amonio (Sul). También se utilizaron diversas fuentes de nitrógeno orgánico: casaminoácidos (Cas), extracto de levadura (Ext), peptona (Pep) y triptona (Trip). Las sales de amonio se adicionaron en una concentración de 1 g/L y las fuentes de nitrógeno orgánico se adicionaron a 0.5 g/L. La cantidad adicionada para el caso de las sales de amonio, se estableció de acuerdo a la cantidad necesaria para inhibir la actividad de la nitrogenasa y con esto evitar la fijación de nitrógeno atmosférico (Klugkist y Haaker, 1984). En el caso de las fuentes orgánicas la cantidad se adicionó con base en experimentos anteriores.

Los resultados se presentan en la *figura 6*. Se observó que las fuentes nitrogenadas que favorecieron una mejor producción de polisacárido fueron el acetato de amonio y el extracto de levadura, obteniéndose 1.3 y 1.04 g/L respectivamente. En estas condiciones, la viscosidad generada en el medio de cultivo fue de 31 cps. El comportamiento en las fuentes nitrogenadas orgánicas fue bastante similar. De hecho, la producción de biomasa fue muy similar en todas ellas, existiendo una diferencia significativa en la producción de alginato.

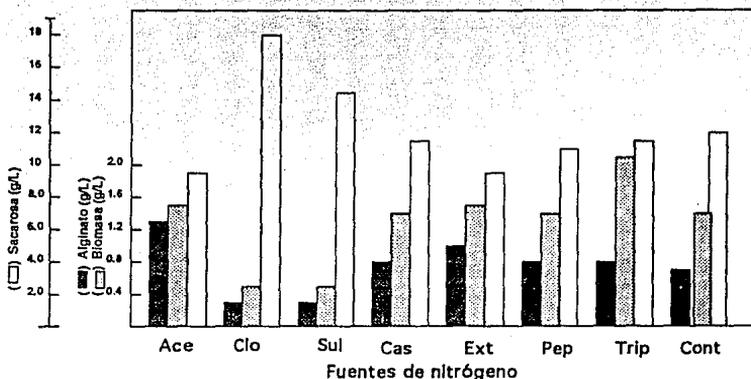


Figura 6.

Crecimiento y producción de alginato de *A. vinelandii* WTC13, en matraces de 250 mL conteniendo 150 mL de medio Burk enriquecido con diferentes fuentes de nitrógeno. Ace, acetato de amonio; Clo, cloruro de amonio; Sul, sulfato de amonio; Cas, casaminoácidos; Ext, extracto de levadura; Pep, peptona; Trip, triptona; Cont, control.

En la figura 6 se puede observar también, que la adición de cloruro o sulfato de amonio inhibieron fuertemente la producción de biomasa y polisacárido. Este efecto negativo de algunas sales de amonio se ha observado en diferentes cepas de *A. vinelandii* (Brivonese y Sutherland, 1989). Sin embargo, no se ha logrado una explicación satisfactoria. Por otro lado, Larsen y Haug, (1971) obtuvieron una mayor producción de alginato y células cuando adicionaron acetato de amonio al medio de cultivo, pero cuando adicionaron cloruro, fosfato

o sulfato de amonio se incrementó la producción de células y se inhibió la síntesis de alginato (considerando como control los cultivos sin adición de fuentes nitrogenadas). La discrepancia de estos resultados reflejan las diferencias en la selección y el manejo realizado sobre las cepas de trabajo.

PRODUCCION DE ALGINATO BAJO DIFERENTES CONCENTRACIONES INICIALES DE EXTRACTO DE LEVADURA Y ACETATO DE AMONIO

Los resultados anteriores son considerablemente bajos con respecto a reportes previos en la literatura (Brivonese y Sutherland, 1989), por lo que se exploraron otros parámetros involucrados en la producción y los rendimientos de alginato. Inicialmente se analizó el efecto de las concentraciones tanto de acetato de amonio, como de extracto de levadura, debido a que éstas fueron las fuentes nitrogenadas con las que se obtuvo mayor producción de alginato. Los resultados se presentan en las figuras 7 y 8. Se observó la máxima producción de alginato (1.61 g/L) al utilizar acetato de amonio a una concentración de 1.0 g/L. En cambio, se obtuvieron 1.64 g/L de alginato como máximo con extracto de levadura a una concentración inicial de 3.0 g/L.

Pudo observarse que en una primera instancia no existieron diferencias significativas en la producción de alginato utilizando una fuente inorgánica de nitrógeno (acetato de amonio 1 g/L) o una fuente orgánica (extracto de levadura 1 o 3 g/L). En estos tres casos, la viscosidad del medio de cultivo fue de 31.0 cps.

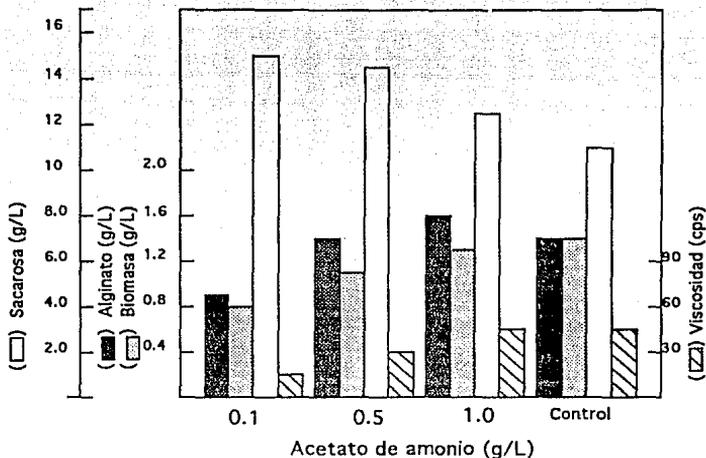


Figura 7.
Producción de alginato bajo diferentes concentraciones de acetato de amonio, creciendo *A. vinelandii* WTC13 en matraces de 250 mL con 150 mL de medio de cultivo. Se utilizó el medio Burk como control.

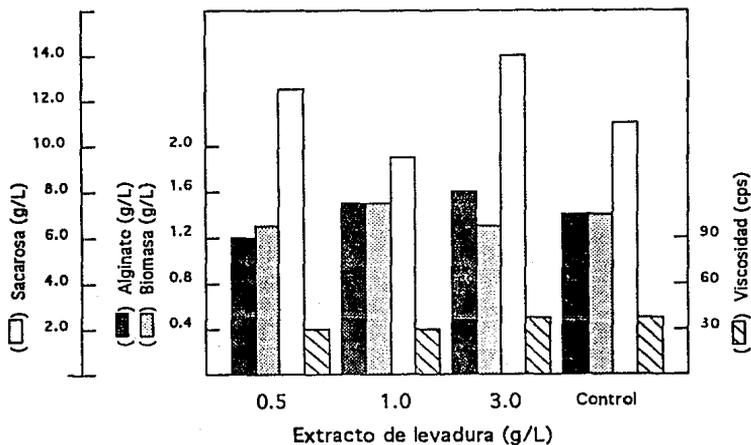


Figura 8.
Producción de alginato bajo diferentes concentraciones de extracto de levadura, creciendo *A. vinelandii* WTC13 en matraces de 250 mL con 150 mL de medio y tomando como control el medio Burk sin nitrógeno.

Bajo esta situación se continuó el estudio con ambas fuentes de nitrógeno ya que dado el alto nivel de sacarosa residual, se requería de buscar elementos adicionales para seleccionar en forma correcta entre ambas. Se decidió trabajar con 3 g/L de extracto de levadura o 1g/L de acetato de amonio para evitar una limitación futura, aunque es claro que de lograrse un alto consumo de sacarosa y que esto conlleve mejores rendimientos de alginato, la concentración de estas fuentes nitrogenadas deberá optimizarse.

PRODUCCION DE ALGINATO BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE AIREACION

Considerando que el oxígeno disuelto en el medio es otro factor importante para la síntesis de alginato, se efectuó un estudio preliminar de su efecto en el proceso de producción de alginato, limitando la cantidad de oxígeno mediante una reducción del área para la transferencia de gases en el matraz. Se utilizaron volúmenes de 50, 100 y 150 mL de medio Burk enriquecido con acetato de amonio o extracto de levadura. Los resultados se muestran en la **figura 9 (a,b,c)**. Se observó un incremento en la producción de alginato en los medios de cultivo tanto con extracto de levadura, como con acetato de amonio y en el medio Burk cuando se utilizó un volumen menor, lo que proporciona mayor aireación en los cultivos agitados (Gaden, 1962; Delgado *et al.*, 1989). Lo anterior demuestra una limitación en la producción de alginato por el oxígeno disponible, independiente del origen de la fuente nitrogenada o inclusive en condiciones de fijación de nitrógeno.

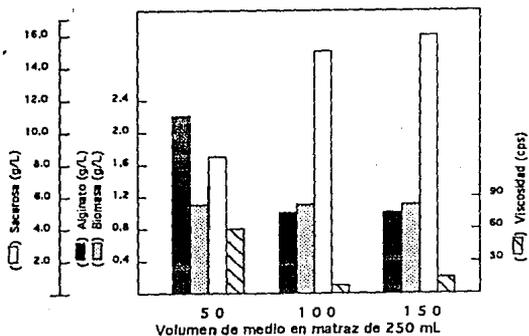
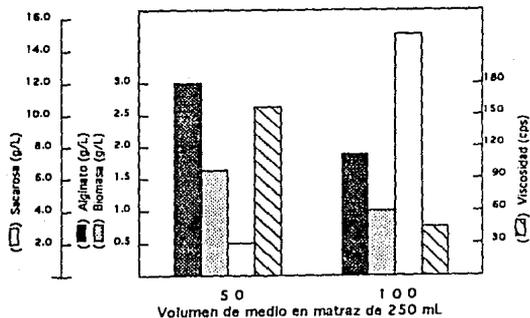
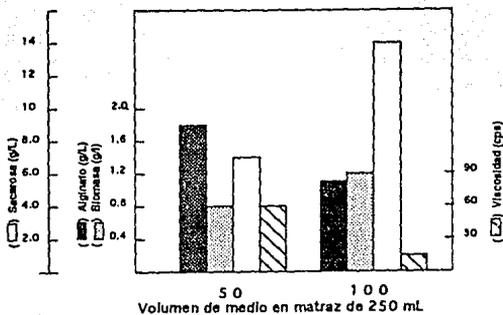


Figura 9.
Efecto del volumen de trabajo del medio en la producción de alginato por *A. vinelandii* WTC13 en matraces de 250 mL
 a) medio Burk enriquecido con acetato de amonio (1g/L)
 b) medio Burk enriquecido con extracto de levadura (3 g/L)
 c) medio Burk como control

Con estos resultados se observó que la mejor condición para la síntesis del polímero resultó ser cuando se emplea extracto de levadura (3 g/L), obteniéndose 2.9 g/L de alginato y una viscosidad en el medio de 165.6 cps. Otro aspecto interesante fue que bajo estas condiciones se consumió el 93% de la sacarosa. Por otro lado, tanto en el medio Burk como en aquel con acetato de amonio, se produjeron 1.8 g/L de alginato cuando se utilizó 50 mL de medio y el consumo de sacarosa también fue alto (77 %). Sin embargo, los niveles de oxígeno disuelto y su influencia en la producción de alginatos solo puede estudiarse apropiadamente en fermentadores, por lo que no se llevaron a cabo más estudios de aireación a nivel matraz.

PRODUCCION DE ALGINATO BAJO DIFERENTES CONCENTRACIONES INICIALES DE SACAROSA

En las mejores condiciones de aireación a nivel de matraz y con exceso de nitrógeno, se analizó el efecto de la concentración inicial de sacarosa en un rango de 15 a 30 g/L. Cabe señalar que la concentración de 20 g/L utilizada en los experimentos anteriores se encuentra reportada en bibliografía como la concentración óptima para la producción de alginatos (Okabe *et al.*, 1981; Annison y Couperwhite, 1984; Brivonese y Sutherland, 1989).

Los resultados se muestran en la figura 10, donde no se observa un efecto relevante al ser la producción de polímero muy similar en todos los casos, variando en un intervalo de 3.2 a 3.8 g/L. En estos experimentos el nivel mayor

de alginato se obtuvo con 20 g/L de sacarosa. A mayores concentraciones, la fracción de sacarosa no consumida se incrementó llegando a ser del 69.1 % en la condición de 30 g/L de sacarosa inicial. En la tabla X se desglosan estos resultados, observándose que el rendimiento de alginato (g de alginato producido/g de sacarosa consumida) fue mayor a 15 g/L de sacarosa inicial. Sin embargo, la diferencia no es muy marcada con respecto al rendimiento obtenido en la condición de 20 g/L.

Okabe *et al.*, (1981) reportaron una fuerte inhibición de la síntesis de alginato a partir de una concentración de sacarosa inicial del 2 % y un aumento del peso seco celular conforme se incrementa la concentración inicial de sustrato. La diferencia en el comportamiento puede ser reflejo del proceso de selección de cepas.

Tabla X. RENDIMIENTOS GLOBALES DE ALGINATO

SACAROSA (g/L)	Sacarosa consumida (g/L)	Alginato producido (g/L)	Rendimiento (gAlg/gSac.)
15	13.63	3.57	0.262
20	15.81	3.80	0.240
25	18.00	3.55	0.197
30	16.20	3.27	0.201

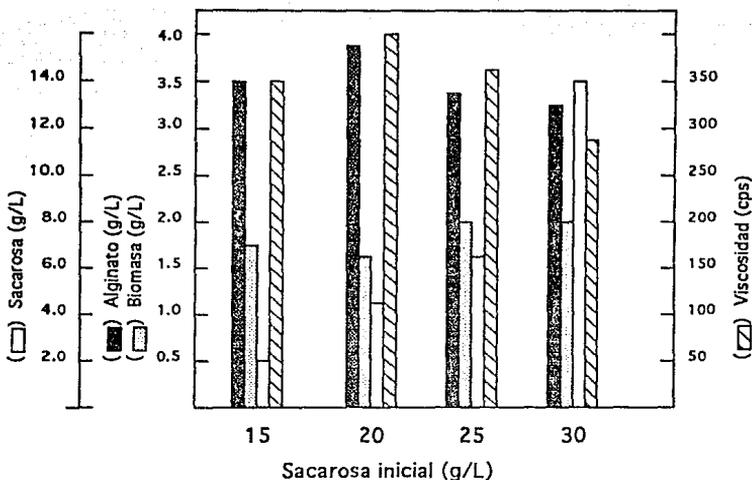


Figura 10.

Producción de alginato a diferentes concentraciones iniciales de sacarosa, utilizando la cepa de *A. vinelandii* WTC13 crecida en matraces de 250 mL con 50 mL de medio Burk enriquecido con extracto de levadura (3 g/L).

Sin poder determinar el factor limitante que en todos los experimentos previos provocaba un alto contenido de sacarosa residual y bajos rendimientos de alginato, se seleccionó la concentración de 20 g/L de sacarosa como concentración de trabajo puesto que las expectativas del proceso, en lo que concierne al efecto del oxígeno (al pasar a fermentador), hacían pensar en incrementos en la producción de alginatos de hasta 10 g/L, considerando los rendimientos logrados en la bibliografía (Brivonese y Sutherland, 1989).

CINETICA DE FERMENTACION EN MATRACES DE 250 mL

Una vez definidas las condiciones de cultivo para la obtención de alginato, se analizó la cinética de fermentación en matraces de 250 mL (figura 11). Durante la fase logarítmica de crecimiento se observó una velocidad de crecimiento de 0.167 h^{-1} , lo cual implica un tiempo de duplicación de 4.15 h. La velocidad de consumo de sustrato fue de $0.316 \text{ g sacarosa/L}\cdot\text{h}$ en la fase logarítmica de crecimiento y la velocidad de formación de alginato fue de $0.0423 \text{ g alginato/L}\cdot\text{h}$ durante todo el tiempo del cultivo. Se observó que tanto la velocidad de consumo de sustrato como la velocidad de formación de producto mostraron un comportamiento lineal durante todo el periodo de fermentación. La viscosidad aumentó linealmente hasta las 40 h. A partir de este tiempo, cuando el cultivo está en la fase estacionaria de crecimiento, la viscosidad se incrementó importantemente hasta las 87 horas que fue el final de la fermentación. A este tiempo de cultivo la viscosidad fue de 403.7 cps.

Durante el transcurso de estas fermentaciones, se realizaron observaciones del cultivo bajo al microscopio óptico, destacando que en las primeras 10 h de cultivo la totalidad de las células presentaron forma bacilar. A partir de las 12 h, las células comenzaron a formar quistes, los cuales se diferencian por su forma circular (Post *et al.*, 1982). Los quistes llegaron a predominar en el medio de cultivo a partir de las 20 h. Después de las 30 h la gran mayoría de las células (alrededor del 95% del campo visual) presentaron forma de quistes.

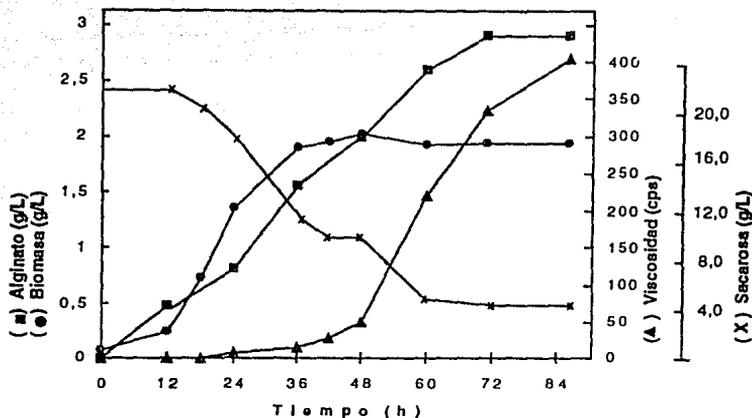


Figura 11.
Cinética de la fermentación de *A. vinelandii* WTC13 crecido en medio Burk enriquecido con extracto de levadura (3 g/L), utilizando matraces de 250 mL con 50 mL de medio de cultivo.

Con estos resultados se consideró tener información suficiente para estudiar el proceso de producción a nivel de fermentador. Si bien el medio de cultivo no había sido optimizado, el efecto de diversos parámetros era claro: en condiciones de fijación de nitrógeno, la producción de alginato es inferior a cuando se adiciona una fuente de nitrógeno. En principio, la fuente nitrogenada puede ser orgánica o inorgánica, ya que en ambos casos se aumenta la producción del polímero. Sin embargo, con extracto de levadura se proporciona algún elemento limitante que conjuntamente con el suministro adecuado de oxígeno (figura 9a), causa un consumo casi total de la sacarosa e

incrementa los niveles de alginato. Se concluye entonces que el efecto del oxígeno en el medio nitrogenado es de gran importancia y repercute sobre todo en los rendimientos del proceso.

CULTIVOS EN FERMENTADOR DE 2 LITROS

Manteniendo las condiciones seleccionadas de cultivo, se realizaron fermentaciones en el fermentador SGI de 2 litros. Las condiciones iniciales de agitación y aireación iniciales fueron de 250 rpm y 0.3 vvm, respectivamente. Estas condiciones, corresponden a niveles bajos de aireación, por lo que el oxígeno disuelto permaneció en cero durante el crecimiento celular. A las 30 h se incrementó ligeramente la agitación (300 rpm) con el fin de mover el medio de cultivo, ya que la viscosidad generada impedía un mezclado adecuado. La cinética de la fermentación se presenta en la figura 12. En estas fermentaciones, la velocidad de crecimiento fue de 0.222 h^{-1} , lo cual representa un tiempo de duplicación de 3.12 h en la fase logarítmica de crecimiento. La velocidad de consumo de sustrato fue de 0.384 g de sacarosa/L*h durante la fase logarítmica de crecimiento y la velocidad de formación de alginato fue de 0.055 g de alginato/L*h.

Es relevante notar que tanto las velocidades de formación de biomasa y producto, como la velocidad de consumo de sustrato calculadas en la fase logarítmica de crecimiento, fueron mayores en comparación con los resultados obtenidos en matraces de 250 mL. De igual forma se incrementaron la producción de biomasa y alginato así como la viscosidad del medio de cultivo.

Las condiciones finales de fermentación fueron: crecimiento celular 2.52 g/L; 496.9 cps de viscosidad; 4.34 g/L de alginato así como un consumo de sustrato del 92 % en 72 horas de cultivo.

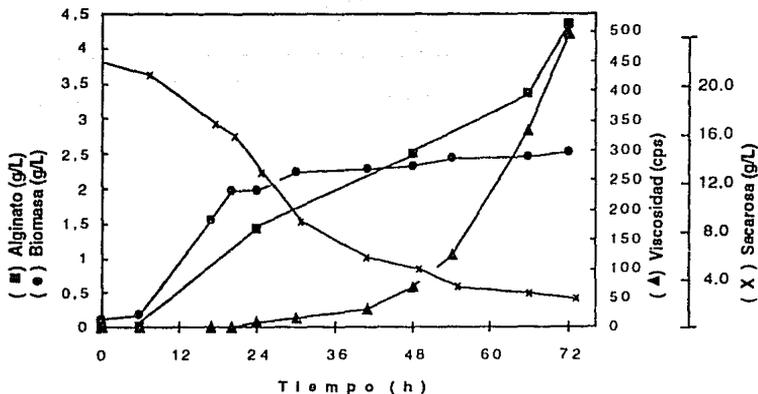


Figura 12. Cultivo de *A. vinelandii* WTC 13 en medio Burk enriquecido con extracto de levadura (3 g/L), utilizando un fermentador de dos litros. Condiciones de agitación y aireación: 300 rpm y 0.3 vvm.

CULTIVOS EN FERMENTADOR DE DOS LITROS MODIFICANDO LAS CONDICIONES DE AIREACION Y AGITACION

Como se pudo notar en los estudios de matraz, el oxígeno es un factor muy importante en los rendimientos del proceso. En los cultivos en fermentador con condiciones de baja agitación y aireación la producción mejoró con respecto al

matraz. Por esta razón se llevaron a cabo fermentaciones en las que la aireación y agitación se modificaron para mantener el oxígeno en un intervalo de 10 al 15 % de saturación. De esta forma, como se demuestra en la figura 13, se logró obtener una mayor cantidad de alginato, llegando a 5.4 g/L en 60 horas de cultivo. Esto representa un 38 % mas con respecto a la fermentación en matraz y un 25 % mas con respecto al fermentador sin control de oxígeno.

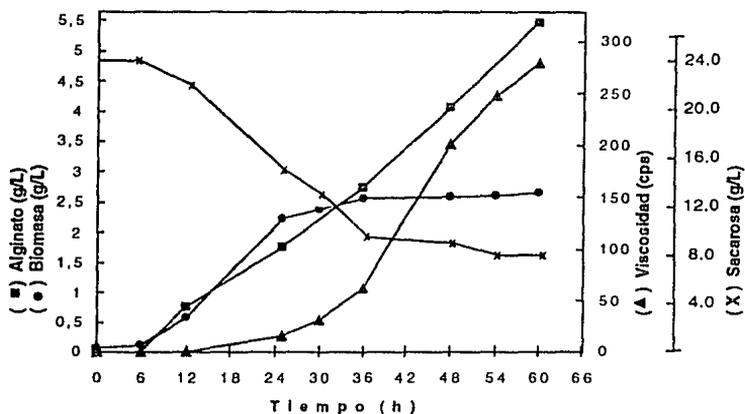


Figura 13.
Fermentación de *Azotobacter vinelandii* WTC13 en fermentador SGI de 1.5 litros de medio Burk enriquecido con extracto de levadura, modificando las condiciones de agitación y aireación. Las condiciones iniciales fueron 300 rpm, 0.3 vvm. Cambiando a 400 rpm a las 12 h; 450 rpm y 0.6 vvm a las 25 h; 550rpm a las 30 h.

En este tipo de fermentaciones fue muy notorio el efecto del oxígeno disuelto sobre las características del producto ya que los niveles de agitación y aireación del medio fueron altas en comparación con las utilizadas en

experimentos anteriores. Se observó que bajo estas nuevas condiciones se generó una mayor producción volumétrica de alginato pero la viscosidad del caldo de fermentación fue considerablemente menor, siendo de 280 cps a las 60 h de cultivo.

Es claro entonces que la selección de las condiciones de aireación y agitación influyen drásticamente sobre las propiedades del producto. Altas tasas de oxigenación sin duda repercuten en la actividad epimerasa, ya que a pesar de incrementarse el nivel de alginato, la viscosidad no lo hace proporcionalmente. La epimerización del ácido manurónico a ácido gulurónico ha sido mencionada como el fenómeno que mas influye en las características reológicas de los alginatos. Se intentó modificar el alginato de baja viscosidad sometiéndolo a la acción de un sobrenadante producido en condiciones de baja aireación (epimerasa alta?). Sin embargo, no se observó cambio en la viscosidad. La dificultad para contar con un método analítico que permita establecer la relación entre la estructura y el comportamiento reológico del alginato, impidió profundizar en este sentido.

MODELOS MATEMATICOS PARA DESCRIBIR LOS DATOS EXPERIMENTALES

Con el fin de describir los resultados obtenidos en los diversos procesos de producción de alginatos (matraz, fermentador sin control del nivel de oxígeno, fermentador con control del nivel de oxígeno), estableciendo la relación de diversos parámetros con la cinética de proceso, se probaron diversos modelos matemáticos. En particular, se estudiaron los modelos descritos por Weiss y

Ollis (1980) y por Kilmek y Ollis (1980), quienes modelaron los procesos de producción de xantanas, pululanas y alginatos. Dado la generalidad de este modelo, se pensó que de adecuarse el proceso de alginatos al modelo de Luedeking y Piret, así como al modelo de consumo de sustrato (ecuación modificada de Luedeking-Piret), sería posible ampliar la generalización hecha por aquellos autores en el modelamiento de fermentaciones para producción de biopolímeros. Además, estos modelos permitirían en un futuro, hacer simulaciones, estudiar la influencia de parámetros, y eventualmente, apoyar el escalamiento del proceso.

El modelo se construyó con las ecuaciones de velocidad para biomasa (X), producto (P) y sustrato (S). En el caso de la biomasa, se utilizó la ecuación logística:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X (1 - X/X_m) \quad (1)$$

donde: μ - velocidad específica de crecimiento
 X_m - máxima concentración de biomasa

Para la velocidad de formación de producto se utilizó la ecuación de Luedeking y Piret (Luedeking y Piret, 1959):

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X \quad (2)$$

donde se utilizan dos términos, uno asociado al crecimiento [$\alpha dX/dt$] y otro no asociado al crecimiento [βX]. Las constantes α y β pueden depender de las condiciones de fermentación (pH, temperatura, etc.), así como de la cepa.

El consumo de sustrato puede modelarse utilizando una forma modificada de la ecuación de Luedeking y Piret. Se considera que el consumo de sustrato depende de la magnitud de tres términos: las velocidades instantáneas de crecimiento de biomasa y formación de producto y una función de mantenimiento de biomasa. La ecuación es una combinación lineal de esos tres parámetros:

$$\frac{dS}{dt} = - \frac{1}{Y_x} \frac{dX}{dt} - \frac{1}{Y_p} \frac{dP}{dt} - m(X) \quad (3)$$

crecimiento producto mantenimiento

donde: Y_x = rendimiento de biomasa en base a sustrato
 Y_p = rendimiento de producto en base a sustrato
 m = coeficiente de mantenimiento

Combinando las ecuaciones (2) y (3) y reorganizando términos:

$$\frac{dS}{dt} = - \frac{1}{Y_x} \frac{dX}{dt} - \frac{1}{Y_p} [\alpha \frac{dX}{dt} + \beta X] - m(X)$$

$$\frac{dS}{dt} = - \left[\frac{1}{Y_x} + \alpha \frac{1}{Y_p} \right] \frac{dX}{dt} - \left[\frac{\beta}{Y_p} X + m \right] (X)$$

$$dS/dt = -n \, dX/dt - m(X) \quad (4)$$

al dividir entre X: $q_s = -n \, \mu - m$ (4')

donde: $n = (1/Y_x + \alpha/Y_p)$ (5)

$m = (\beta/Y_p + m)$ (6)

FORMAS INTEGRADAS DE LAS ECUACIONES

La integración y rearreglo de la ecuación (1) genera la siguiente ecuación:

$$X_{(t)} = X_0 e^{\mu t} / [1 - (X_0/X_m) (1 - e^{\mu t})] \quad (7)$$

La integración de la ec. (2) y posterior sustitución de la ec. (7) genera la evolución de P en el tiempo:

$$P_{(t)} = P_0 + \alpha (X_m/\mu) \ln [1 - (X_0/X_m) (1 - e^{\mu t})] + \beta X_0 \{e^{\mu t} / [1 - (X_0/X_m) (1 - e^{\mu t})]\} \quad (8)$$

Finalmente, de la integración de la ec. (4) y la sustitución de la ec. (5) resulta en una expresión que describe la evolución de S en el tiempo:

$$S_{(t)} = S_0 - n (X_{(t)} - X_0) - m (X_m/\mu) \ln [1 - (X_0/X_m) (1 - e^{\mu t})] \quad (9)$$

CALCULO DE LAS CONSTANTES INVOLUCRADAS EN LOS MODELOS

La velocidad específica de crecimiento (μ) se calculó obteniendo la pendiente que resulta de graficar $\ln[(X_{(t)}/X_m)] / [1 - (X_{(t)}/X_m)]$ contra el tiempo, usando los datos obtenidos durante la fase exponencial de crecimiento. En la **figura 14** se presentan estas gráficas y los valores se reportan en la **tabla XI**, para las fermentaciones en matraz descritas en la **figura 11**, así como para las fermentaciones en fermentador de dos litros sin control del nivel de oxígeno (**figura 12**) y en condiciones de control del nivel de oxígeno (**figura 13**).

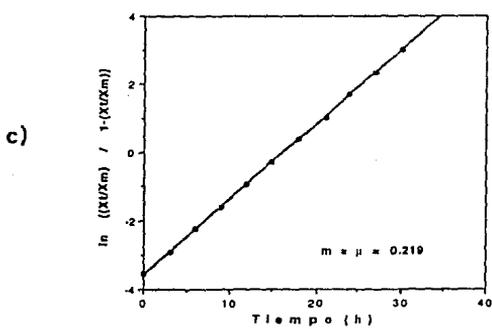
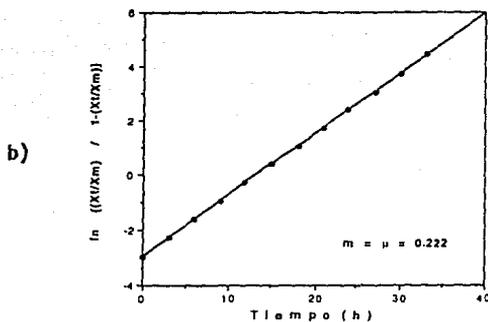
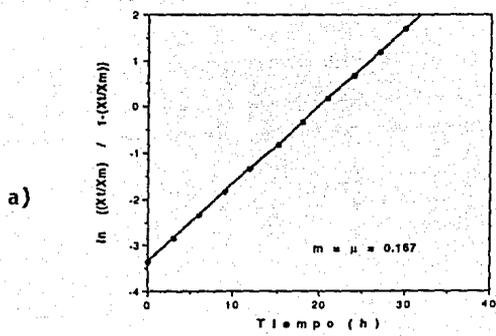


Figura 14.

Cálculo de la velocidad específica de crecimiento para los cultivos de *Azotobacter vinelandii* bajo diferentes condiciones de crecimiento.

- a) Cultivos en matraz de 250 mL con 50 mL de medio
- b) Cultivos en fermentador de dos litros sin control de oxígeno
- c) Cultivos en fermentador de dos litros con control de oxígeno

La velocidad específica de crecimiento calculada para los cultivos realizados en matraces fue de 0.167 h^{-1} , equivalente a un $t_d=4.15 \text{ h}$. Para el caso de los cultivos en fermentador sin control de oxígeno, se calculó una μ de 0.222 h^{-1} equivalente a un $t_d=3.12 \text{ h}$. Este último valor es semejante al obtenido para los cultivos en fermentador en los que se mantuvo constante el oxígeno disuelto entre el 10 y el 15%. Los valores fueron $\mu=0.218 \text{ h}^{-1}$ equivalente a un $t_d=3.18 \text{ h}$. De esta manera, se observó que la μ permaneció sin cambiar bajo las diferentes condiciones de aireación en el fermentador y fue notablemente inferior en las fermentaciones realizadas en matraces de 250 mL.

Una forma de evaluación de las constantes α y β de la ecuación de Luedeking-Piret es partiendo de la ecuación (2), el parámetro β se evalúa a partir de los datos de dP/dt tomados de la curva de crecimiento en la fase estacionaria:

$$\beta = (dP/dt) / X_m$$

El valor de (dP/dt) se obtuvo a partir de los incrementos de P en el tiempo en los datos experimentales, los resultados se muestran en la tabla XI.

El parámetro α se obtiene a partir de la ecuación (8) rearrreglada:

$$P(t) = P_0 + \alpha X_0 \{ e^{\mu t} / [1 - (X_0/X_m) (1 - e^{\mu t})] \} + \beta (X_m/\mu) \ln [1 - (X_0/X_m) (1 - e^{\mu t})] \quad (8)$$

de tal forma que:

$$P(t) - P_0 = \alpha X_0 \{ e^{\mu t} / [1 - (X_0/X_m) (1 - e^{\mu t})] \} + \beta (X_m/\mu) \ln [1 - (X_0/X_m) (1 - e^{\mu t})]$$

como $X_{(t)} = X_0 \{ e^{\mu t} / [1 - (X_0/X_m) (1 - e^{\mu t})] \}$

al graficar:

$P - P_0 - \beta (X_m/\mu) \ln [1 - (X_0/X_m) (1 - e^{\mu t})]$ vs $X_t - X_0$ se obtiene el valor de α de la pendiente (figura 15).

La ecuación (4) en la fase estacionaria puede simplificarse en:

$$dS/dt = - m (X)$$

por lo que el valor de m puede obtenerse directamente de la pendiente de la gráfica de los datos experimentales.

Finalmente, el parámetro n se obtiene de la ecuación (9) graficando:

$$S_0 - S_{(t)} - m (X_m/\mu) \ln [1 - (X_0/X_m) (1 - e^{\mu t})]$$
 vs $X - X_0$

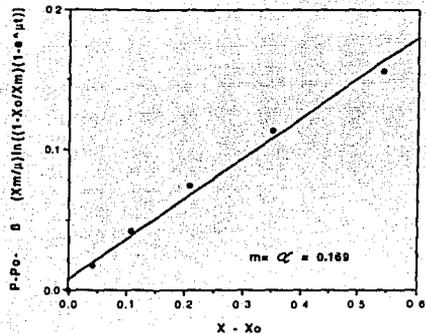
de donde el valor de n se obtiene de la pendiente (figura 16).

De esta manera, se calcularon los diferentes parámetros (μ , n , m , α , y β) mientras que los parámetros X_m y X_0 se obtuvieron directamente de los datos experimentales. Los valores obtenidos se enlistan en la tabla XI.

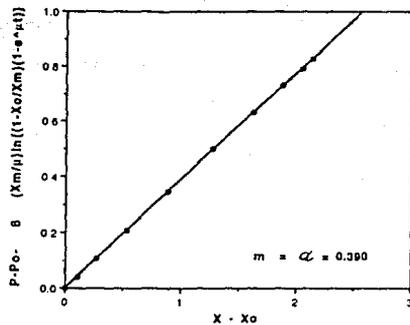
Tabla XI. VALORES DE LAS CONSTANTES IMPLICADAS EN LOS MODELOS MATEMATICOS

Condiciones de fermentación	μ (h ⁻¹)	β (gAlg/gBiom h)	α (gAlg/gBiom)	n (gSac/gBiom)	m (gSac/gBiomh)
Ferm. en matraz	0.167	0.0227	0.169	1.375	0.247
Ferm. sin control de O ₂	0.222	0.0261	0.390	2.331	0.1834
Ferm. con control de O ₂	0.218	0.0422	0.357	2.936	0.1724

a)



b)



c)

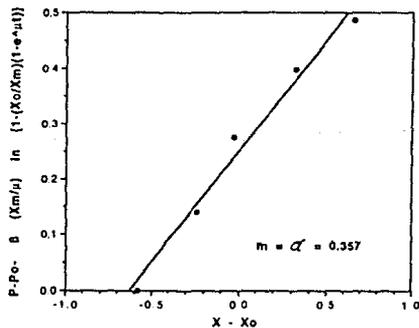


Figura 15.

Cálculo de los valores de la constante α del modelo de Luedeking-piret.

a) Cultivos en matraces de 250 mL

b) Cultivos en fermentador de dos litros sin control de oxígeno

c) Cultivos en fermentador de dos litros con control de oxígeno

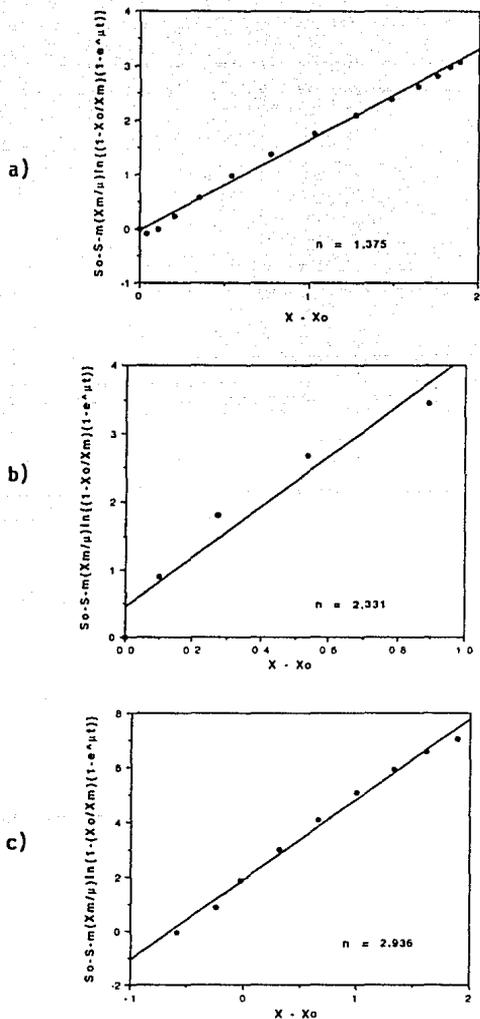


Figura 16.
Cálculo de los valores de la constante n del modelo modificado de Luedeking-Piret.

- a) Cultivos en matraces de 250 mL
- b) Cultivos en fermentador sin control de oxígeno
- c) Cultivos en fermentador con control de oxígeno

En general, los valores de las constantes fueron menores para el caso de los cultivos en matraz con respecto a los obtenidos para los cultivos en fermentador. Lo anterior es un reflejo de las mayores producciones de alginato en los fermentadores; por otra parte, las constantes del modelo utilizado engloban a todos los parámetros que pudieran afectar o influir sobre la producción de alginato (pH, concentración de oxígeno, etc.), por lo que el modelo no puede tener en cuenta cambios en los parámetros ocasionados por el cambio de escala.

Las constantes obtenidas para los cultivos en fermentador (con y sin regulación de oxígeno) presentaron un valor semejante, únicamente el valor de la constante β fue considerablemente mayor para el caso del fermentador con control de oxígeno. Esta es una constante relacionada con la velocidad específica de formación de producto en la fase estacionaria de crecimiento y dicha velocidad fue notablemente superior en las fermentaciones con control del nivel de oxígeno, ya que se produjeron 5.5 g/L de alginato en 60 horas de cultivo mientras, que en las fermentaciones sin control de oxígeno se produjeron 4.5 g/L en 72 horas.

Los datos obtenidos en el presente trabajo difieren de los reportados por Kllmek y Ollis (1980), para la síntesis de alginato. Estos autores describen la cinética de fermentación de un cultivo limitado en fosfatos y bajo condiciones de fijación de nitrógeno. Ellos describen la producción de alginato reportada en

la bibliografía como completamente asociada al crecimiento ($\beta = 0$), mientras que en el presente trabajo se observó que la formación de alginato se efectúa de manera constante durante todo el tiempo de la fermentación (β tiene un valor mayor de cero) y parcialmente asociada al crecimiento.

Los datos obtenidos se emplearon en los modelos propuestos, integrando las diferentes ecuaciones de velocidad, para generar así los resultados que se presentan en las figuras 17,18 y 19, en donde se demuestra que las ecuaciones matemáticas resultantes describen satisfactoriamente los datos experimentales. Tal como supone el modelo de Luedeking-Piret, en este caso existe una relación lineal entre la velocidad específica de síntesis de producto y la velocidad específica de producción de biomasa. Aunque las ecuaciones integradas de velocidad se graficaron a partir de los datos experimentales, si no se cumple con la premisa mencionada el modelo no describiría correctamente los datos experimentales. A pesar de esto, se observa que la ecuación de consumo de sustrato se desvía del comportamiento teórico hacia el final de la fermentación. Esto es debido a que el modelo predice un consumo total y de forma lineal del sustrato. En cambio, la velocidad de consumo de sustrato disminuye hacia el final de la fermentación y no se consume completamente el sustrato. En la caracterización del proceso se comentó sobre el hecho de que existe siempre una cantidad de sacarosa sin consumir, lo cual sugiere la existencia de un factor limitante en el medio de cultivo, como podrían ser los fosfatos, ya que se adicionan en bajas concentraciones.

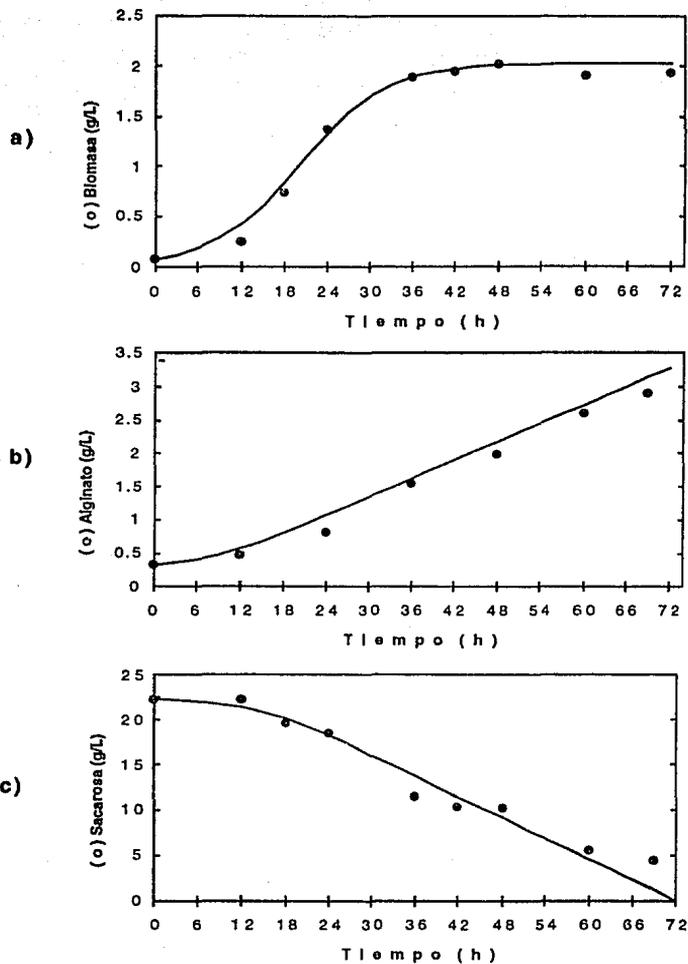


Figura 17. Comparación entre los modelos matemáticos generados a partir de los datos experimentales (líneas continuas) y los datos experimentales observados en fermentaciones en matraces de 250 mL.
 a) Crecimiento celular
 b) Formación de producto (alginato)
 c) Consumo de sustrato

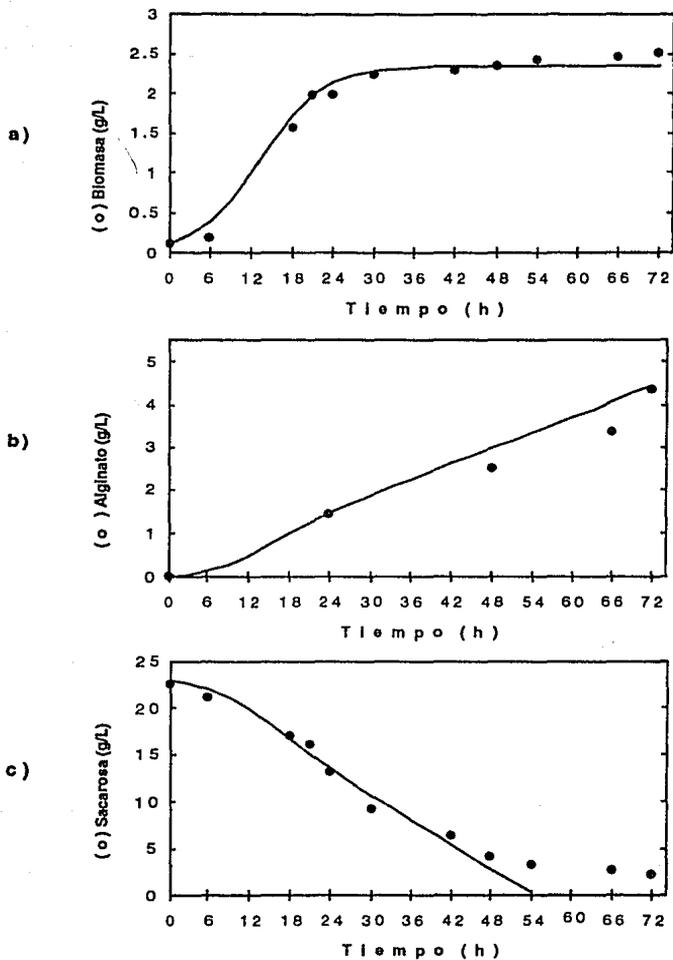


Figura 18.
Comparación entre los modelos matemáticos generados a partir de los datos experimentales (líneas continuas) y los datos experimentales obtenidos en fermentaciones sin control del nivel de oxígeno.
a) Crecimiento celular
b) Formación de producto
c) Consumo de sustrato

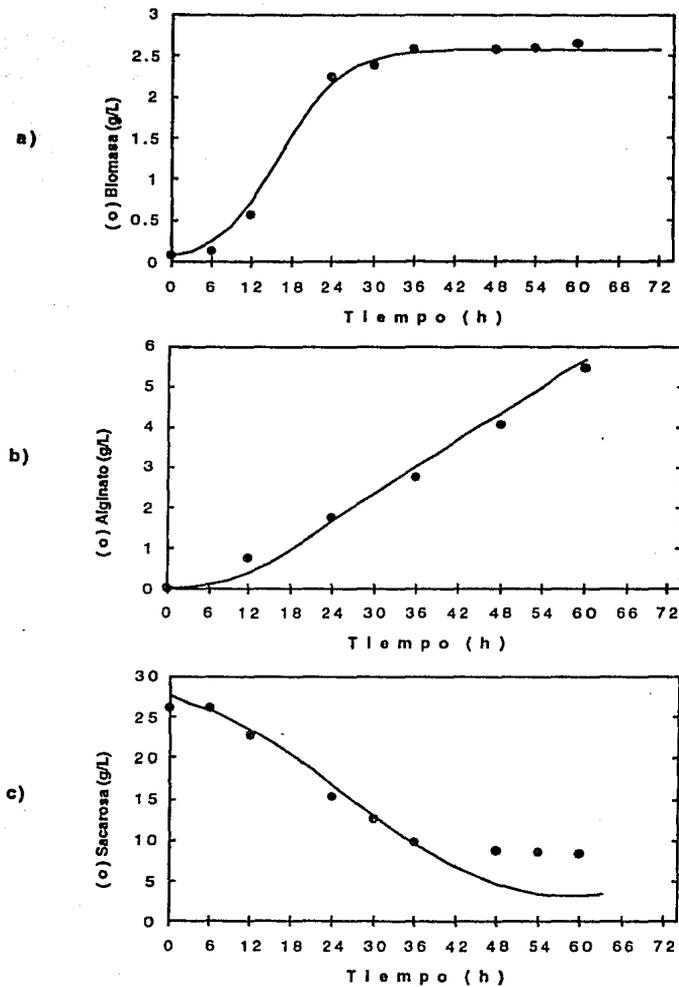


Figura 19.

Comparación entre los modelos matemáticos generados a partir de los datos experimentales (líneas continuas) y los datos experimentales obtenidos en fermentaciones con control del nivel de oxígeno.

- a) Crecimiento celular
- b) Formación de producto
- c) Consumo de sustrato

VII) CONCLUSIONES

En el proceso de producción de alginato existen diversos elementos de fundamental importancia en la eficiencia de la cepa. Se demostró el efecto del nitrógeno en la producción de alginato. Se encontró que las fuentes orgánicas y en particular el extracto de levadura favorecen la producción con respecto al medio no nitrogenado. Este elemento aunado al suministro adecuado de oxígeno, permiten además un consumo eficiente del sustrato. Queda sin embargo, como una tarea de optimización el estudio de la relación C/N óptima para el proceso.

La cepa de trabajo fue aislada de la cepa silvestre ATCC 9046 mediante resiembras y selección de colonias que a la vista presentaran un aspecto más mucoso. Esta simple metodología, además de permitir preservar la cepa, es un apoyo para su selección con base en sus niveles de producción de alginato en los cultivos en medio líquido.

Dada la importancia de la oxigenación en el proceso, demostrado en experimentos con matraz, se estudió su efecto en fermentadores. En estas condiciones no solo se demostró la importancia de la aireación en la cinética del proceso sino también en las características reológicas del producto. Desafortunadamente no se cuenta con un método adecuado para determinar la estructura del producto. Esta es una condición necesaria para estudiar el efecto estructura-reología y la relación que guarda con el proceso de producción.

Finalmente, se aplicaron modelos matemáticos previamente utilizados en la descripción de la cinética de producción de polisacáridos microbianos como la xantana, la pululana y el alginato. En términos generales, estos modelos se aplican al caso de alginato aunque existen diferencias con respecto al modelado de la producción de alginato en condiciones de fijación de nitrógeno.

En esta tesis se presentan las condiciones básicas de producción de alginato microbiano, que permitirán establecer comparaciones en el futuro cuando eventualmente se logre un mejoramiento de la cepa por ingeniería genética. En las condiciones actuales el proceso se encuentra en vías de escalamiento en lo cual los aspectos fundamentales para la producción del alginato son el suministro adecuado de oxígeno, el control de la espuma y la regulación del pH.

Cabe hacer mención que los rendimientos obtenidos siguen siendo moderados, lo cual resalta la necesidad de realizar un proceso de optimización del medio y condiciones de cultivo (principalmente los aspectos de agitación/aireación), por otro lado, mejoras subsecuentes podrían eventualmente surgir del mejoramiento genético de la cepa de trabajo.

VIII) BIBLIOGRAFIA

Anderson, A., H. Parolis, and L. Parolis. (1987) Structural investigations of the capsular polysaccharide from *Escherichia coli* 09:K37:A84a. *Carbohydr Res* 163: 81-90.

Annisson, G. and I. Couperwhite. (1984) Consequences of the association of calcium with alginate during batch culture of *Azotobacter vinelandii*. *Appl Microbiol Biotechnol* 19:321-325.

Bemiller, J. (1989) Trends in industrial polysaccharide research. En: V. Crescenzi, I. Dea, S. Paoletti, S. Stivala and I. Sutherland (Eds) *Biomedical and biotechnological advances in industrial polysaccharides*. Gordon and Breach Sci. Publishers, New York, pp. 517-534.

Brant, D. (1991) Solution properties and conformational aspects of alginates. Conferencia presentada en: First course on alginates and their application. Recent progresses in research and technology. Trondheim, Norway. June 2-5.

Brivonese, A. and I. Sutherland. (1989) Polymer production by a mucoid strain of *Azotobacter vinelandii* in batch culture. *Appl Microbiol Biotechnol* 30:97-102.

Corona, F. (1987) Modelo cinético mezclado de la fermentación de goma xantana. Tesis. *Ingeniería química*. Escuela de Ingeniería química. Universidad Autónoma de Puebla. pp.139 .

Davidson, I., I. Sutherland and C. Lawson (1977) Localisation of o-acetyl groups of bacterial alginate. *J Gen Microbiol* 98: 603-606.

Deavin, L., T. Jarman, C. Lawson, R. Righelato and S. Slocombe. (1977) The production of alginic acid by *Azotobacter vinelandii* in batch and continuous culture. En: P. Sandford y A. Laskin (Eds) *Extracellular microbial polysaccharides*. American Chemical Society Washington, pp.14-26.

Delgado, G., M. Topete and E. Galindo. (1989) Interaction of cultural conditions and end-product distribution in *Bacillus subtilis* grown in shake flasks. *Appl Microbiol Biotechnol* 31:288-292.

Gaden, E. (1962) Improved shaken flask performance. *Biotechnol Bioeng*. 4:99-103.

Galindo, E. (1985) Polisacáridos microbianos. En: Quintero, R. (Comp.) *Prospectiva de la Biotecnología en México*. Fundación Javier Barros Sierra A. C. México D. F., pp. 65-92.

Gorin, P. A. and F. Spencer. (1966) Exocellular alginic acid from *Azotobacter vinelandii*. *Can J Chem* 44:993-998.

Haug, A. and B. Larsen (1971) Biosynthesis of alginate. Part II. Polymannuronic acid C-5 epimerase from *Azotobacter vinelandii* (LIPMAN) *Carbohydr Res* 17: 297-308.

Horan, N., T. Jarman and E. Dawes (1981) Effects of carbon source 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.

Jarman, T., L. Deavin, S. Slocombe, and R. Righelato. (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. and G. Pace. (1984) Energy requirements for microbial exopolysaccharide synthesis. *Arch Microbiol* 137 (10): 231-235.

Kenne, L. and B. Lindberg. (1983) Bacterial Polysaccharides. En: G. Aspinall (Ed) *The Polysaccharides*. Vol. 2. Academic Press, New York, pp. 87-363.

Klimek, J. and D. Ollis. (1980) Extracellular microbial polysaccharides: kinetics of *Pseudomonas* sp., *Azotobacter vinelandii*, and *Aureobasidium pullulans* batch fermentations. *Biotechnol Bioeng* 22: 2321-2342.

Klugkist, J. and H. Haaker. (1984) Inhibition of nitrogenase activity by ammonium chloride in *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol* 157: 148-151.

Larsen, B. and A. Haug. (1971) Biosynthesis of alginate. Part I. Composition and structure of alginate produced by *Azotobacter vinelandii* (LIPMAN) *Carbohydr Res* 17:287-296.

Luedeking, R. and E. Piret. (1959) A kinetic study of the lactic acid fermentation: Batch process at controlled pH. *J Biochem Microbiol Technol Eng* 1: 393-431.

Margaritis, A. (1985) Microbial polysaccharides. En: M. Moo-Young (Ed) *Comprehensive Biotechnology*. Vol. 3 Elsevier Applied Science, New York, pp. 1005-1044.

May, T., D. Shinabarger, R. Maharaj, J. Kato, L. Chu, J. DeVault, S. Roychoudhury, N. Zielinski, A. Berry, R. Rothmel, T. Misra and A. Chakrabarty. (1991) Alginate synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* : a key pathogenic factor in chronic pulmonary infections of cystic fibrosis patients. *Clinical Microb Rev* 4(2):191-206.

Morris, J. V. (1987) New and modified polysaccharides. En: R. King y P. Cheetham (Eds) *Food Biotechnology*. Elsevier Appl Sci, NY, pp. 193-248.

Okabe, E., M. Nakajima, H. Murooka and K. Nisizawa. (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, W. (1987) Microbial Gums. En: J. Bu'lock and B. Kristiansen (Eds) *Basic Biotechnology*. Academic Press. New York pp. 449-463.

Page, W. and H. Sadoff. (1975) Relationship between calcium and uronic acids in the encystment of *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol* 122: 145-151.

Pindar, D. and C. Bucke. (1975) The biosynthesis of alginic acid in *Azotobacter vinelandii*. *J Biochem* 152: 617-22.

Post, E., R. Golecki and J. Oelze. (1982) Morphological and ultrastructural variations in *Azotobacter vinelandii* growing in oxygen-controlled continuous culture. *Arch Microbiol* 133:75-82

Punita, S., A. Jafri H. Reddy and K. Das. (1989) Multiple chromosomes of *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol* 171 (6): 3133-3138.

Sadoff, I., B. Shimel and S. Elliss. (1979). Characterization of *Azotobacter vinelandii* desoxyribonucleic acid and folded chromosomes. *J Bacteriol* 138 (3): 871-877.

Sandford, P. and J. Baird. (1983) Industrial utilization of polysaccharides. En: G. Aspinall (Ed) *The Polysaccharides*. Vol. 2 Academic Pres, New York, pp. 411-491.

Sandford, P., I. Cottrell and D. Pettitt. (1984) Microbial polysaccharides: New products and their commercial applications. *Pure and Appl Chem* 56 (7): 879-892.

Singh, S., S. Hogan, D. Feingold and B. Larsen. (1987) Mucoid strains of *Pseudomonas aeruginosa* are devoid of mannuronan C-5 epimerase. *Microbios* 51:7-13.

Skjak-Braek, G., H. Grasdalen and L. Larsen. (1986) Monomer sequence and acetylation pattern in some bacterial alginates. *Carbohydr Res* 154:239-250.

Stephenson, P., F. Jackson and E. Dawes (1978) Further observations on carbohydrate metabolism and its regulation in *Azotobacter vinelandii* *J Gen Microbiol* 109:89-96.

Stevenson, L. and M. Socolofsky (1966) Cyst formation and poly- β -hydroxybutyrate accumulation in *Azotobacter*. *J Bacteriol* 91: 304-310.

Sutherland, I. W. (1977) Bacterial polysaccharides - their nature and production. En: I. Sutherland (Ed) *Surface carbohydrates of the prokaryotic cell*. Academic Press, London, pp. 27-96.

Sutherland, I. W. (1989) Microbial Polysaccharides -Biotechnological products of current and future potential. En: V. Crescenzi, M. Dea, S. Paoletti, S. Stivala and I. Sutherland (Eds) *Biomedical and biotechnological advances in industrial polysaccharides*. Gordon and Breach Sci. Publishers, New York, pp. 123-143.

Sutherland, I. W. (1990) *Biotechnology of microbial exopolysaccharides*. Cambridge University Press, New York, pp.163.

Weiss, R. and D. Ollis. (1980) Extracellular microbial polysaccharides. I.Substrate, biomass, and product kinetic equations for batch xanthan gum fermentation. *Biotechnol Bioeng* 22: 859-873.

Wells, J. (1977) Extracellular microbial polysaccharides, a critical overview. En: P. A. Sanford and A. Laskin (Eds) *Extracellular microbial polysaccharides*. Washington D.C., American Chemical Society, pp. 299-313.

Yalpani, M. and P. Sandford. (1987) Commercial polysaccharides: Recent trends and developments. En: M. Yalpani (Ed) *Industrial polysaccharides: Genetic Engineering, structure/property relations and applications*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 311-333.