

EL PROCESO DE INOCULACIÓN DETERMINA LA CINÉTICA DE LOS CULTIVOS DE *Azotobacter vinelandii* Y EL PESO MOLECULAR DEL ALGINATO

Mauricio A. Trujillo-Roldán, Carlos Peña y Enrique Galindo
Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis
Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México
Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca 62250, Morelos, MEXICO
Fax: (777) 3172388, e-mail: maurotru@ibt.unam.mx

Palabras clave: *alginate*, *Azotobacter vinelandii*, *inoculación*

Introducción. La producción de alginatos por *A. vinelandii* en cultivo sumergido implica una serie de pasos, incluyendo la preparación del inóculo. El proceso típico de inoculación consiste en la proliferación de células en un precultivo, donde el medio de cultivo agotado, junto con las células, es adicionado al nuevo medio en el fermentador (1).

A. vinelandii produce la enzima alginasa que depolimeriza el alginato, observándose una disminución en el peso molecular promedio (PMP) del polímero (1, 2). Con el fin de evitar la presencia de componentes (que incluyen alginasa y alginato) provenientes del inóculo, se realizaron cultivos inoculados con células lavadas (CICL) y se compararon con aquellos convencionalmente inoculados (CCI). En este trabajo se determinó como estos componentes provenientes del inóculo afectan la biosíntesis del alginato y sus características moleculares.

Metodología. Los cultivos se llevaron a cabo en lote en un fermentador de 1.0 L a 3 % de TOD constante y a 700 rpm, utilizando la cepa silvestre (ATCC9046) y la mutante SML2 incapaz de producir alginasas (2). Con técnicas gravimétricas se midieron la concentración de biomasa y de alginato (1). Los PMP e índices de polidispersión (IP) se cuantificaron por cromatografía de filtración en gel (1), en un equipo de HPLC y la actividad alginasa por un método espectrofotométrico (2). Los CCI fueron llevados a cabo adicionando al nuevo medio de cultivo en el fermentador (900 mL), el preinóculo completo de matraces Erlenmeyer (100 mL), mientras que los CICL fueron realizados usando células lavadas como inóculo, colectadas por centrifugación (15500 x g), resuspendidas en nuevo medio de cultivo (100 mL) y adicionadas al fermentador (900 mL).

Resultados y Discusión. La velocidad específica de crecimiento y la concentración final de biomasa (fig. 1.a) de los CCI ($\mu=0.21 \text{ h}^{-1}$ y 4.0 g/l) fueron muy similares a los que se observaron en los CICL ($\mu=0.20 \text{ h}^{-1}$ y 3.8 g/l). Se obtuvo una concentración final del alginato de 3.5 g/l en los CICL, que resultó más baja que la obtenida en los CCI (4.8 g/l). En todos los cultivos, la sacarosa (20 g/l) fue consumida totalmente (datos no presentados).

En los CICL, se obtuvieron alginatos de alto peso molecular (1200 KDa, fig. 1.c) y con menor polidispersión (IP = 6.0) comparado con el alginato obtenido en los CCI (PMP = 350 KDa, IP = 8.2). Al utilizar células lavadas, la actividad

máxima de la enzima alginato-liasa se presentó a la mitad de la fase exponencial de crecimiento (CCI) mientras que en el CICL se observó hasta la fase estacionaria (fig. 1.d). Un comportamiento similar fue observado utilizando una cepa mutante SML2, incapaz de producir alginasas (2). Se obtuvo un alginato de 908 KDa y un IP de 5.5 en los cultivos CICL, mientras que en los CCI el PMP fue de 475 y el IP de 7.2.

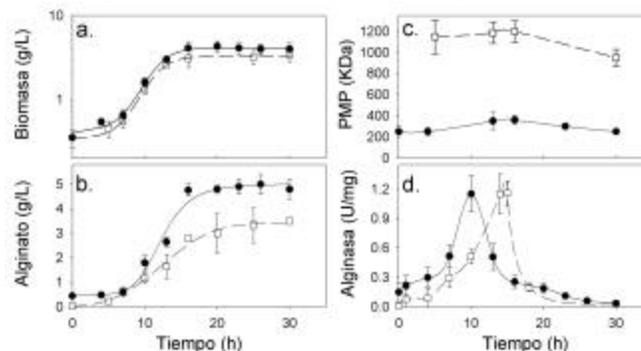


Fig. 2 Cinéticas de crecimiento de biomasa (a), producción de alginato (b), PMP (c), y actividad específica alginasa (d) de cultivos llevados a cabo con la cepa silvestre, en CCI (?) y CICL (?).

Conclusiones. Los componentes provenientes del inóculo desempeñan un papel importante en la biosíntesis del alginato y en la definición de sus características moleculares. Lavando las células, es posible evitar la presencia de tales componentes, aumentando dramáticamente el PMP del alginato y reduciendo su índice de polidispersión. Al evitar estos componentes, se podrán llevar a cabo estudios detallados de la biosíntesis de alginato.

Agradecimientos. Trabajo financiado por DGAPA-UNAM (proyecto 218201). M.A.T.R. agradece a DGEP-UNAM y a COLCIENCIAS-Colombia, por su beca de postgrado. La cepa SML2 fue construida por el grupo de la Dra. Guadalupe Espín (IBT-UNAM).

Bibliografía

- Peña, C., Trujillo-Roldán, M.A., Galindo, E. (2000) Influence of dissolved oxygen tension and agitation speed on alginate production and its molecular weight in cultures of *Azotobacter vinelandii*. *Enzyme Microb Technol* 27 (6):380-387
- Trujillo-Roldán MA, Moreno S, Galindo E, Espín G (2003) Alginate production by an *Azotobacter vinelandii* mutant unable to produce alginate lyase. *Appl Microbiol Biotechnol* 60:733-737