



XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



EXPRESIÓN DE *alg8* Y PRODUCCIÓN DE ALGINATO EN CULTIVO CONTINUO DE *Azotobacter vinelandii*

Erik Soto, Claudia Altamirano y Álvaro Díaz, Escuela de Ingeniería Bioquímica, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Av. Brasil 2147, Casilla 4059, Valparaíso, Chile, e-mail: alvaro.diaz@ucv.cl

Palabras claves: alginato, *Azotobacter vinelandii*, *alg8*.

Introducción. *Azotobacter vinelandii* es una bacteria que produce alginato y polihidroxibutirato (PHB). El alginato es un polisacárido constituido por ácido β -D-manurónico y ácido α -L-gulurónico, siendo la distribución y cantidad de estos ácidos lo que determina sus propiedades. Se ha propuesto que la proteína Alg8 (expresada por el gen *alg8*) es parte del complejo polimerasa responsable de polimerizar el alginato (1). El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la velocidad de agitación sobre la producción de alginato y la expresión del gen *alg8* en cultivos continuos de *A. vinelandii*.

Metodología. *A. vinelandii* ATCC 9046 fue cultivada en un medio Burk modificado con sacarosa 10 y 20 g/L y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,8 g/L. Se realizaron quimiostatos simples en un biorreactor de 3 L (Applikon) a 30°C y pH 7,0 controlado automáticamente. Los quimiostatos operaron a $D = 0,1 \text{ h}^{-1}$, 1 vvm y a 300, 500 y 700 rpm. Cada estado estacionario se alcanzó después de tres tiempos de residencia. La biomasa, amonio, sacarosa y alginato se cuantificaron como se ha descrito previamente (2). El O_2 en fase gas se determinó con un detector paramagnético y el CO_2 con un analizador infrarrojo. Con un balance de O_2 y CO_2 y con la biomasa en estado estacionario, se calculó la velocidad específica de consumo de O_2 (q_{O_2}) y de producción de CO_2 (q_{CO_2}). La expresión de *alg8* se determinó por PCR cuantitativa en tiempo real usando el gen *gyrA* como housekeeping (3). Los resultados se muestran como el promedio de triplicados con desviaciones estándares menores a 10%.

Resultados. La Tabla 1 muestra la concentración de biomasa, alginato, PHB, q_{O_2} y q_{CO_2} a diferentes velocidades de agitación. Un aumento en la velocidad de agitación incrementó la q_{O_2} y el contenido de PHB. A una velocidad de agitación intermedia (500 rpm) se favoreció la producción de alginato (1,8 g/L). A la más alta velocidad de agitación estudiada (700 rpm), la q_{CO_2} fue superior (5,4 veces) a la obtenida en las otras velocidades de agitación evaluadas, sugiriendo una mayor proporción de carbono distribuida hasta CO_2 .

Tabla 1. Biomasa, alginato, PHB, q_{O_2} y q_{CO_2} a distintas velocidades de agitación en cultivos continuos con 10 g/L de sacarosa en la alimentación.

rpm	Biomasa [g/L]	Alginato [g/L]	PHB [%p/p]	q_{O_2} [mmol/g h]	q_{CO_2} [mmol/g h]
300	2,4	1,2	15,9	1,0	1,2
500	2,0	1,8	20,9	2,5	1,2
700	3,0	1,1	39,8	4,2	6,5

La Figura 1 muestra la velocidad específica de producción de alginato (q_p) y la expresión de *alg8* en quimiostatos realizados a diferentes velocidades de agitación con 10 y 20 g/L de sacarosa en la alimentación.

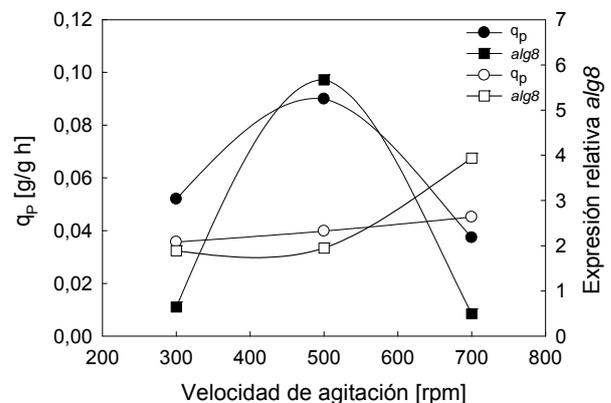


Fig. 1. Expresión de *alg8* y q_p a diferentes concentraciones de sacarosa en la alimentación como función de la velocidad de agitación. 10 g/L sacarosa (●, ■); 20 g/L sacarosa (○, □)

En los quimiostatos con 10 g/L de sacarosa en la alimentación, la expresión de *alg8* y q_p fueron afectados por cambios en la velocidad de agitación. Los resultados muestran por primera vez que en células de *A. vinelandii* cambios en la expresión de *alg8* podrían explicar las diferentes q_p observadas a las distintas velocidades de agitación. Previamente, en cultivos de *P. aeruginosa* con copias adicionales del gen *alg8*, se observó una relación similar (4).

Conclusiones. La velocidad de agitación afectó la q_p y la expresión del gen *alg8* en quimiostatos de *A. vinelandii*, sugiriendo que cambios en la producción de alginato podrían ser explicados por una variación en la expresión de dicho gen.

Agradecimiento. Proyecto PBCT PSD081, CONICYT (Chile).

Bibliografía.

- (1) Díaz-Barrera A, Soto E (2010). *Af. J. Biotechnol.* 9 (33): 5240-5250.
- (2) Díaz-Barrera A, Peña C, Galindo E (2007). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76 (4): 903-910.
- (3) Noguez R, Segura D, Moreno S, Hernandez A, Juarez K, Espín G (2008). *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 15 (4): 244-254.
- (4) Remminghorst U, Rehm B.H.A (2006). *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (1): 298-305.