



XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



EXPRESIÓN DE GENES INVOLUCRADOS EN LA POLIMERIZACIÓN DEL ALGINATO PRODUCIDO POR *Azotobacter vinelandii* EN FUNCIÓN DEL OXÍGENO DISUELT

Celia Flores, Soledad Moreno, Daniel Segura, Carlos Peña y Enrique Galindo

Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología/UNAM. Apdo. Post. 510-3, Cuernavaca, 62250 Morelos, MEXICO. Fax: (52) (777) 3 13 88 11, e-mail: celia@ibt.unam.mx

Palabras clave: expresión génica, polimerización, alginato.

Introducción. El alginato es un polisacárido de importancia comercial por su capacidad viscosificante y gelificante (1). El peso molecular (PM) del alginato determina su viscosidad en suspensión. La tensión de oxígeno disuelto (TOD) determina el PM del polímero (2); sin embargo, no se ha investigado cómo es que la TOD influye sobre la polimerización del alginato y genera cambios en su PM. Es probable que la expresión de los genes involucrados tanto en la polimerización del alginato, como en la depolimerización, sean afectados por la TOD del cultivo.

En este trabajo se analizó la influencia de la tensión de oxígeno disuelto (1 y 5%) sobre la expresión de genes de polimerización (*alg8* y *alg44*) y de depolimerización (*algL*, *alyA1*, *alyA2*, *alyA3* y *algE7*) y su relación con el PM del alginato sintetizado por *A. vinelandii*. Además, se analizó la expresión de *algX* (cuyo producto está involucrado en transporte del polímero a través de la membrana periplásmica, para su posterior excreción).

Metodología. Se usó la cepa *A. vinelandii* ATCC9046. Se realizaron cultivos en biorreactores de 3 L, a 29°C, pH= 7.2 y 500 rpm. La TOD se controló mediante mezcla de oxígeno y nitrógeno y un controlador proporcional integral derivativo (PID) (2). El PM del alginato se determinó por HPLC (cromatografía de filtración en gel) (2). En el análisis de PCR de tiempo real las reacciones se realizaron por duplicado (para cada gen y para cada TOD). Se analizaron dos etapas del cultivo (fase exponencial (F EXP) e inicio de fase estacionaria (F EST)). Se usó el gen *gyrA* (que codifica para una subunidad de la DNA girasa) como control interno. Los datos se analizaron por el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (3). El tamaño de todos los amplímeros fue de 100-101 pb. Los resultados se analizaron considerando como condición referencia el cultivo desarrollado a 5 % de TOD.

Resultados. En cultivos a 1 % de TOD la bacteria sintetizó alginato de hasta 1200 kDa; mientras que a 5%, el PM del polímero no rebasó los 60 kDa (figura 1a). En los cultivos a 1%, los genes *alg8* y *alg44* incrementaron considerablemente su expresión, respecto de la condición referencia (5 % de TOD), en las dos etapas del cultivo evaluadas (figura 1b). En F EXP, la expresión de *alg8* y *algX* se incrementó hasta 9 unidades relativas; *alg44* en 5 unidades relativas. En F EST el nivel de expresión de los tres genes evaluados fue también mayor que en el cultivo a 5 % (entre 4 y 5 unidades relativas).

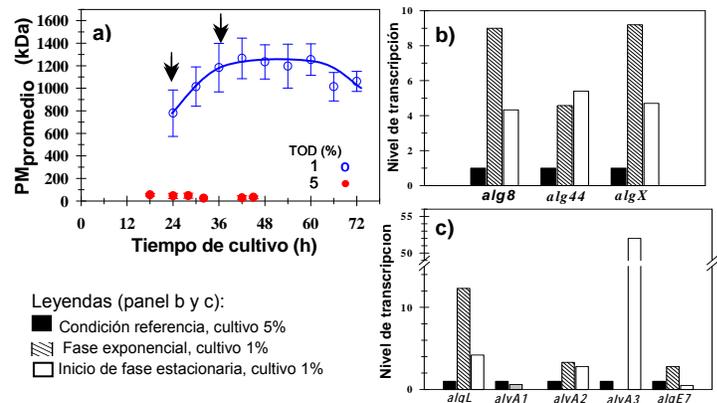


Fig. 1. Influencia de la TOD sobre el PM (a); y sobre la expresión de los genes de polimerización (*alg8*, *alg44*) y gen de transporte (*algX*) (b); y sobre los genes de depolimerización (c), *algL*, *alyA1*, *alyA2*, *alyA3* y *algE7* en cultivos de *A. vinelandii*. Las flechas en el panel a) indican las etapas analizadas para el PCR en tiempo real.

En el genoma de *A. vinelandii* están presentes alginasas cuya actividad es la responsable de la disminución del PM del alginato, por ello, se analizó el nivel de expresión de los genes *algL*, *alyA1*, *alyA2*, *alyA3* y *algE7* cuyo producto presenta actividad alginasa (figura 1c). En F EXP la expresión del *algL* se incrementó hasta 11 unidades relativas y en F EST disminuyó hasta 4. La expresión de *alyA1* fue menor al cultivo referencia en las dos etapas evaluadas. Para *alyA2*, su expresión fue ligeramente mayor (en dos unidades) y permaneció constante, respecto del cultivo referencia. Para *alyA3* no se detectó expresión en F EXP; sin embargo, en F EST se detectaron hasta 50 unidades relativas. Ello contrastó con el incremento en el PM del alginato. *algE7* incrementó su expresión en 1.8 unidades sólo en F EXP.

Conclusiones. El incremento en el PM de alginato estuvo relacionado con el incremento en la transcripción de genes de polimerización (*alg8* y *alg44*) y de transporte (*algX*). Interesantemente, los genes que codifican para proteínas con actividad liasa (excepto *alyA1*) también mostraron un aumento en su expresión con respecto a la condición de referencia.

Agradecimientos. Financiamiento CONACyT (proyecto 57220).

Bibliografía.

- August, A.D., Kong, H. J. and Mooney D. J. (2006). *Macromol. Biosci.* 6: 623-633.
- Trujillo-Roldán, M., Moreno, S., Espín, G. and Galindo, E. (2004). *Appl Microbiol Biotechnol* 63: 742-747.
- Livak K, Schmittgen, TD. (2001). *Methods* 25: 402-408.