

OBTENCIÓN DE ALGINATOS DE ALTO PESO MOLECULAR USANDO UNA CEPA LIASA DE *Azotobacter vinelandii*

Mauricio A. Trujillo-Roldán, Soledad Moreno, Guadalupe Espín y Enrique Galindo
Departamentos de Bioingeniería y de Microbiología Molecular
Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México
Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca 62250, Morelos, MEXICO
Fax: (52)(7) 3172388, e-mail: maurotru@ibt.unam.mx

Palabras clave: *alginato*, *Azotobacter vinelandii*, *peso molecular*

Introducción. El alginato es un polímero lineal constituido por residuos de ácidos manurónico (M) y gulurónico (G) (1). El peso molecular (PM) del alginato determina en buena medida la capacidad viscosificante en solución. Esta característica está asociada directamente al valor agregado del polímero. En cultivo, *A. vinelandii* produce la enzima alginasa que degrada el alginato, atacando primordialmente los enlaces M-M y G-M. Esta degradación se observa como una disminución (de hasta un orden de magnitud) en el peso molecular promedio (PMP) del polímero (1). Generar un mutante que carezca de dicha actividad produciría alginatos de alto PMP. Por otra parte, se ha demostrado la gran importancia de las condiciones de cultivo en el peso molecular promedio (PMP) del alginato (1). El objetivo de este trabajo fue producir alginatos de alto PMP, usando una mutante alginasa y condiciones de cultivo que maximicen el PMP.

Metodología. La cepa mutante LSM (liasa) de *A. vinelandii* se construyó por mutagénesis dirigida usando un casete de resistencia a gentamicina y se eligió aquella de orientación no polar. Esta fue mantenida y crecida en medio Burk modificado. Los cultivos se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer a 29°C y 200 rpm. Los cultivos (en lote) se desarrollaron en un fermentador de 1.0 L a 3 % de TOD constante (1) y a 300 rpm. Con técnicas gravimétricas se midieron la concentración de biomasa y de alginato. Los PMP e índices de polidispersión (IP) se cuantificaron por cromatografía de filtración en gel (1), en un equipo de HPLC.

Resultados y Discusión. La figura 1 presenta la evolución del PMP del alginato por *A. vinelandii* LSM. La depolimerización del alginato no se presenta al final del cultivo (ni en matraces ni en fermentador), debido a la naturaleza de la mutación de la cepa LSM en el gen *algL* (responsable de la producción de la liasa).

A. vinelandii LSM cultivada en matraces presentó los más altos rendimientos de alginato en base a biomasa ($Y_{p/x} = 2.2 \text{ g}_{\text{alg}}/\text{g}_{\text{biom}}$), reportados hasta ahora. El PMP máximo ($\text{PMP}_{\text{max}} = 934 \text{ KDa}$) obtenido en matraces, fue similar al reportado para la cepa silvestre (1).

Al escalar este cultivo a biorreactor de 1.0 L y bajo condiciones de agitación (300 rpm) que promueven la producción de alginatos de alta talla molecular (1), se obtuvo un mayor PMP_{max} del alginato (1344 KDa), comparado con el

cultivo en matraces. Sin embargo, la velocidad específica de crecimiento fue tres veces mayor ($\mu = 0.12 \text{ h}^{-1}$) y el rendimiento ($Y_{p/x}$) fue considerablemente menor, al igual que la concentración final de polímero (tabla 1). El índice de polidispersión (IP) de los alginatos obtenidos con *A. vinelandii* LSM en matraces y en fermentador fue similar entre ellos y menor al reportado para la cepa silvestre (1).

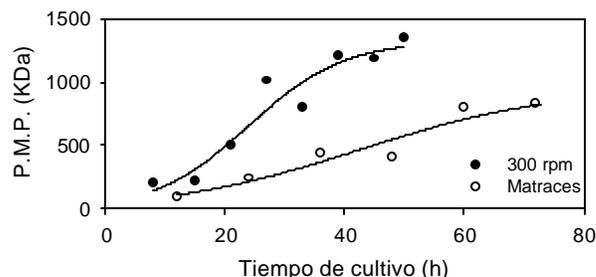


Fig. 1. Evolución del PMP producido por *A. vinelandii*, bajo diferentes condiciones de cultivo.

Tabla 1. Crecimiento bacterial, producción de alginato y su PMP_{max} por *A. vinelandii* LSM, al final del cultivo.

Condiciones de cultivo	Biomasa (g/L)	μ (h^{-1})	Alginato (g/L)	$Y_{p/x}$ ($\text{g}_{\text{alg}}/\text{g}_{\text{biom}}$)	PMP_{max} (KDa)	IP
Matraces	3.4	0.04	7.9	2.2	934	3.0
Biorreactor (TOD = 3 %)						
300 rpm	7.7	0.12	2.9	0.40	1344	3.1

Conclusiones. Con herramientas moleculares y de bioingeniería fue posible obtener un alginato de alto PMP y baja polidispersión en cultivo en fermentador. Con la mutante LSM no se observó degradación del alginato al final del cultivo.

Agradecimientos. Trabajo financiado por CONACyT (proyecto 31540-B). M.A.T.R. agradece el apoyo de DGEP-UNAM (Beca de Doctorado) y a la Fundación "Francisco José de Caldas", COLCIENCIAS-Colombia.

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.