



PONTIFICIA  
UNIVERSIDAD  
CATÓLICA DE  
VALPARAÍSO

PROGRAMA DE DOCTORADO  
EN BIOTECNOLOGÍA CONJUNTO



UNIVERSIDAD TÉCNICA  
FEDERICO SANTA MARÍA

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALPARAÍSO  
UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA

PROGRAMA CONJUNTO DE DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA

**Evaluación del efecto de las condiciones hidrodinámicas sobre la  
respiración celular y la calidad del alginato producido por  
*Azotobacter vinelandii***

Tesis presentada para la obtención del Grado Académico  
**DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA**

**Alumna:  
Belén Ponce Martínez**

**Profesor Guía:  
Álvaro Díaz Barrera**

**Profesora Co-guía:  
Victoria Santos Mazorra**

**Octubre 2025**

## CONSTANCIA DE VALIDACIÓN Y CONFIDENCIALIDAD DE MONOGRAFÍA A REPOSITORIO ACADÉMICO

### 1.- IDENTIFICACIÓN DEL TRABAJO ACADÉMICO

Tipo de monografía (marcar una opción):  Memoria o trabajo de título  Tesis de Postgrado

Título del trabajo: \_\_ Evaluación del efecto de las condiciones hidrodinámicas sobre la respiración celular y la calidad del alginato producido por *Azotobacter vinelandii* \_\_

Nombre del candidato(a): \_\_ Belén Haydée Ponce Martínez \_\_

Carrera / Grado: \_\_ Doctora en Biotecnología \_\_

Campus: \_\_ Valparaíso \_\_ Departamento: Departamento de Química e Ingeniería Ambiental de la USM

### 2.- VALIDACIÓN DEL PROFESOR GUÍA/DIRECTOR DE TESIS

Yo, \_\_ Alvaro Díaz Barrera \_\_, en mi calidad de profesor(a) guía/director(a) del trabajo académico mencionado anteriormente **DEJO CONSTANCIA** que:

- He revisado esta versión del documento y corresponde a la versión final aprobada del trabajo.
- El trabajo cumple con los requisitos académicos y de formato establecidos por la institución.

### 3.- EVALUACIÓN DE CONFIDENCIALIDAD POR PROPIEDAD INDUSTRIAL (marcar una opción)

X El trabajo **NO contiene** información que amerite confidencialidad y puede ser publicado de inmediato en repositorio con acceso abierto.

El trabajo **CONTIENE** información con potenciales implicancias de propiedad industrial o intelectual y requiere un periodo de confidencialidad (**embargo**) por (**marcar una opción**):

6 meses  12 meses  2 años  3 años  5 años  10 años

**Fundamentación de la necesidad de confidencialidad (obligatorio si se solicita embargo):**

---

---

---

### 4.- FIRMAS

Profesor(a) guía o director(a) de memoria o tesis:

Fecha: \_\_ 11-11-2025 \_\_ Firma: \_\_\_\_\_

Estudiante o Candidato(a):

Fecha: \_\_ 17-11-2025 \_\_ Firma: \_\_\_\_\_

*Este formulario debe ser insertado como página 2 de la memoria o tesis, completado y firmado por estudiante y profesor(a) antes de la entrega en portal PRISMA de Biblioteca USM.*

## COMISION EVALUADORA

Dr. Jorge Olivares : \_\_\_\_\_

Dra. Beatriz Cámara : \_\_\_\_\_

Dr. Claudio Martínez : \_\_\_\_\_

Dr. Rodrigo Andler : \_\_\_\_\_

## DEDICATORIA

*¿No has sabido, no has oído que el Dios eterno es Jehová,  
el cual creó los confines de la tierra?  
No desfallece, ni se fatiga con cansancio,  
y su entendimiento no hay quien lo alcance.  
Él da esfuerzo al cansado, y multiplica las fuerzas al que no tiene ningunas.  
Los muchachos se fatigan y se cansan, los jóvenes flaquean y caen;  
pero los que esperan a Jehová tendrán nuevas fuerzas;  
levantarán alas como las águilas; correrán, y no se cansarán;  
caminarán, y no se fatigarán.”  
(Isaías 40:27-31)*

Gracias a Dios por la oportunidad de haber podido realizar mis estudios de postgrado y llevarlos a término, porque sin Su ayuda nada de esto hubiese sido posible.

Agradezco profundamente a mi Familia por su amor, apoyo y dedicación en la concreción de este proyecto tan importante. A mis padres, **Eliseo y Haydée**, a quienes amo, y a pesar de las dificultades, siempre me brindaron toda la ayuda y fortaleza necesarias para continuar.

Este logro se lo dedico especialmente a **mi madre**, quien ya no se encuentra físicamente conmigo, pero sé que **desde el Seol** contempla con orgullo la culminación de esta etapa. Sin su amor, guía y ejemplo, no sería quien soy hoy.

Agradezco también a **mi hermano Eliseo** y a **mi cuñada Rebeca**, por estar siempre a mi lado, por su apoyo incondicional y por alentarme a seguir adelante incluso en los momentos más difíciles. Su compañía y cariño fueron esenciales para alcanzar esta meta, sin ellos no lo hubiese logrado, ¡los amo chicos!

A mis **amigos**, quienes en los momentos más difíciles me brindaron su ayuda, su cariño, su alegría y siempre una risa para hacer más llevadero este camino. Aunque no siempre estuvieron físicamente conmigo, nunca me dejaron sola, y su presencia constante —aun a la distancia— fue una gran ayuda durante todo este proceso. **Silvi, Iván, Karlo, Agustín, Diego, José, Edgar, Cami y Fernando**, ¡los quiero muchísimo! Gracias por ser parte de esta historia y acompañarme con tanto cariño en cada paso.

Quiero agradecer con especial afecto a mis **amigos de España del grupo FQPIMA**: **Itziar, David, Lucija, Yosra, Ivan, Celia, Tomás, Víctor, Jorge, Santi, María Rosa, Ainhoa,**

*Alberto y Gema*, quienes hicieron de mi experiencia en ese país una etapa inolvidable y que llevo conmigo siempre. Desde los cantos en el laboratorio hasta las salidas a comer o los cafés compartidos, vivimos momentos llenos de alegría y amistad que guardaré siempre con mucho cariño. Gracias por hacer mi aventura por España tan divertida y por recordarme, entre risas, que “no tenía el perfil de chilena normal” —¡y quizás tenían razón!

Agradezco también a mis colegas y amigos del **grupo de laboratorio de Cultivos Celulares de la EIB** y al **grupo de investigación de Alginato-PHB-PHBV** por su apoyo constante durante el desarrollo de esta tesis. A *Viviana, Fabián, Andrés, Eduardo, Johan, Andrés P., Débora, Pablo, Paola, Luciano y Paula* gracias por acompañarme en este camino, por su ayuda, sus consejos, las risas compartidas y también por los momentos de frustración que, sin duda, hicieron más valiosa esta experiencia. Su compañerismo y buena disposición marcaron una etapa que recordaré siempre con mucho cariño.

Finalmente, deseo expresar mi agradecimiento a mis **directores de tesis**, el **Dr. Álvaro Díaz** y la **Dra. Victoria Santos**, por su guía, apoyo y orientación durante el desarrollo de esta investigación. Su experiencia, y disposición fueron fundamentales para alcanzar los objetivos de este trabajo y para mi crecimiento profesional y personal.

## RESUMEN

El presente trabajo evaluó el efecto de las condiciones hidrodinámicas sobre la respiración celular, la morfología, la expresión génica y la calidad del alginato producido por *Azotobacter vinelandii* ATCC 9046, ampliando el rango experimental de agitación de 100 a 900 rpm respecto a estudios previos. Esta investigación buscó establecer las condiciones óptimas de operación para maximizar la producción de un biopolímero de alta calidad y comprender los mecanismos fisiológicos y moleculares que lo regulan.

En primer lugar, se realizó un estudio donde se correlacionó los parámetros hidrodinámicos con los indicadores fisiológicos de respiración —velocidad de consumo de oxígeno (VCO) y velocidad específica de consumo de oxígeno ( $qO_2$ )— y con la producción y calidad del alginato. Se determinó que entre 200 y 500 rpm se alcanza un equilibrio óptimo entre respiración celular y síntesis polimérica, mientras que a velocidades  $\geq 600$  rpm se evidenció estrés de cizallamiento con disminución de la  $qO_2$ , reducción del peso molecular del polímero sin embargo aumentó la producción de alginato como respuesta al efecto hidrodinámico. El segundo objetivo abordó la evaluación de la respiración celular y la morfología bacteriana bajo diferentes velocidades de agitación entre 100 y 900 rpm. A bajas velocidades de agitación las células mostraron morfologías pequeñas y regulares, en cambio a altas velocidades ( $\geq 600$  rpm), se observaron deformaciones celulares, fragmentación de la matriz y pérdida de integridad morfológica, coherentes con una disminución en la  $qO_2$  y que la hidrodinámica si afecta a la célula. A 500 rpm las células mantuvieron morfología intacta, y alta productividad, generando alginatos con mayor PMP de alginato, grado de acetilación y proporción G/M similar.

Finalmente se realizó un estudio de calidad del alginato y se estableció una relación con el análisis molecular y la formulación de hidrogeles a partir del alginato bacteriano obtenido en condiciones controladas. El estudio de expresión génica reveló que la intensidad de cizallamiento modula la regulación de genes clave: *rpoS* y *algU* (respuesta al estrés y regulación global), cadena respiratoria, y de biosíntesis, epimerización y acetilación del alginato). Estos resultados confirmaron que la respiración y la biosíntesis del polímero están coordinadas a nivel transcripcional, afectando directamente las propiedades del biopolímero. Los hidrogeles formulados con el alginato bacteriano mostraron estructura porosa homogénea, alta estabilidad estructural, evidenciando su potencial para aplicaciones en biomedicina.

# AGRADECIMIENTOS

Esta tesis doctoral se realizó con el apoyo de la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID) mediante la Beca de Doctorado Nacional **N°21201148**, que permitió la dedicación exclusiva a la investigación y formación académica durante el desarrollo de este trabajo.

Asimismo, se agradecen los **beneficios complementarios otorgados por ANID**, que contribuyeron significativamente al fortalecimiento de la investigación, tales como:

- Gastos operacionales.
- Pasantías en el extranjero.

De igual forma, se reconoce el valioso apoyo de las becas internas otorgadas por la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso (PUCV) y la Universidad Técnica Federico Santa María (UTFSM), entre ellas:

- Becas presentación de congresos PUCV y UTFSM.
- Becas Estancia de investigación PUCV.
- Beca de mantención PUCV
- Beca de exención de arancel PUCV.
- Beca del Programa de Iniciación a la Investigación Científica N° 008/2022

Finalmente, se agradece el respaldo de los siguientes proyectos de investigación, que brindaron apoyo técnico y financiero durante la ejecución de esta tesis:

- FONDECYT Regular N° 1231075.
- Proyecto ECOS ANID 2022 N° C21E01.
- Proyecto Europeo PCI2022-132971 bioMAT4EYE

# INTRODUCCIÓN

El alginato es un biopolímero perteneciente a la familia de los polisacáridos lineales, compuesto por proporciones variables de residuos de ácido  $\beta$ -D-manurónico (M) y ácido  $\alpha$ -L-gulurónico (G). Su versatilidad lo hace valioso como agente espesante, gelificante y estabilizante en diversas aplicaciones industriales.

*Azotobacter vinelandii* es una bacteria aerobia estricta productora de alginato, caracterizada por su alta velocidad de respiración. Tiene la capacidad de sintetizar otros compuestos como el Polihidroxitirato (PHB). La síntesis de alginato es un proceso de alta demanda energética, lo que se refleja en una alta velocidad de consumo de oxígeno (VCO). Durante su crecimiento, el oxígeno disuelto en el cultivo tiende a ser cercano a cero, generando limitación de oxígeno. En este contexto, la velocidad de transferencia de oxígeno (VTO) se vuelve constante y equivale a la VCO. Se ha demostrado que la VTO afecta el peso molecular del alginato, y que la VCO podría influir tanto en su producción como en la expresión de genes implicados en su biosíntesis.

El aumento en la velocidad de agitación incrementa la VTO, sin embargo, se ha descrito que existe un límite donde las fuerzas de cizallamiento pueden generar estrés celular y disminuir la VCO. Se ha observado que altos valores de velocidad específica de consumo de oxígeno ( $qO_2$ ) aumentan la producción de alginato, pero disminuyen su peso molecular, probablemente por la sobreexpresión de enzimas como las alginato liasas. Sin embargo, aún no se comprende del todo cómo el esfuerzo hidrodinámico afecta directamente la actividad respiratoria y la calidad del polímero. Estudios en otros microorganismos sugieren que la  $qO_2$  puede ser un indicador de estrés celular inducido por fuerzas de cizallamiento. Por tanto, analizar su comportamiento en función de la agitación permitiría identificar rangos operativos seguros (sin daño celular) y zonas de estrés (donde la respiración disminuye). Esta estrategia aún no se ha aplicado específicamente en *A. vinelandii* para el estudio de la producción de alginato.

En este contexto, resulta relevante evaluar si los cambios en las condiciones hidrodinámicas mediante la variación de la velocidad de agitación afectan la respiración celular y, en consecuencia, influyen sobre el peso molecular y la calidad del alginato producido. Tal información permitirá optimizar las condiciones de operación en biorreactores, maximizando la productividad sin comprometer la integridad celular ni las propiedades del biopolímero.

# ÍNDICE GENERAL

<b>1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>1</b>
1.1. Generalidades del alginato .....	1
1.1.1. Estructura del alginato.....	1
1.1.2. Propiedades físicas del alginato.....	2
1.1.3. Propiedades biológicas del alginato.....	5
1.2. Aplicaciones del alginato .....	6
1.3. Características generales de <i>Azotobacter vinelandii</i> .....	9
1.4. Producción de PHB .....	10
1.5. Biosíntesis de alginato.....	11
1.5.1. Síntesis del precursor del alginato .....	15
1.5.2. Polimerización .....	15
1.5.3. Modificación, transporte y secreción .....	16
1.6. Regulación relacionada con la biosíntesis y modificación del alginato.....	19
1.7. Respiración en <i>A. vinelandii</i> .....	23
1.7.1. Parámetros de cultivo que afectan la respiración en <i>A. vinelandii</i> .....	25
1.7.2. Respiración de <i>A. vinelandii</i> y su relación la producción de alginato.....	27
1.8. Efectos de las condiciones de hidrodinámica .....	34
<b>2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>37</b>
<b>3. HIPÓTESIS.....</b>	<b>38</b>
<b>4. OBJETIVOS .....</b>	<b>38</b>
4.1. Objetivo general: .....	38
4.2. Objetivos específicos.....	38
<b>5. METODOLOGÍA.....</b>	<b>39</b>
5.1. Metodología experimental .....	39
5.1.1. Microorganismo y preservación .....	39
5.1.2. Preservación de <i>Azotobacter vinelandii</i> .....	39
5.1.3. Medio de cultivo.....	40
5.1.4. Preparación y esterilización del medio de cultivo .....	40
5.1.5. Preparación y esterilización del medio de cultivo en el reactor.....	40
5.1.6. Preparación del pre-inóculo. ....	41
5.1.7. Preparación de inóculos.....	41
5.2. Metodología analítica.....	42
5.2.1. Determinación de la concentración de biomasa por método gravimétrico....	42

5.2.2.	Determinación de la concentración de sacarosa por hidrólisis ácida-DNS ...	42
5.2.3.	Extracción y cuantificación del alginato .....	44
5.2.4.	Determinación peso molecular de alginato promedio .....	44
5.2.5.	Determinación del contenido de ácido manurónico y ácido gulurónico.....	45
5.2.6.	Determinación del grado de acetilación del alginato .....	45
5.2.7.	Cuantificación del contenido de PHB .....	46
5.2.8.	Determinación de la expresión génica .....	47
5.2.9.	Determinación de la morfología celular utilizando SEM .....	48
5.2.10.	Determinación de la viscosidad.....	48
5.3.	Preparación de hidrogeles de alginato bacteriano .....	49
5.3.1.	Formación de hidrogeles de alginato bacteriano con reticulación iónica .....	49
5.3.2.	Prueba de estabilidad de hidrogeles de alginato bacteriano .....	49
5.3.3.	Microscopia electrónica de Barrido (SEM) .....	50
5.3.4.	Cuantificación de espectros de hidrogeles de alginato por FTIR-ATR.....	50
5.4.	Determinación experimental de parámetros de transferencia y consumo de oxígeno .....	50
5.4.1.	Calibración sensor de oxígeno disuelto.....	50
5.4.2.	Determinación de $kLa$ .....	51
5.4.3.	Corrección del tiempo de respuesta del electrodo de oxígeno disuelto .....	51
5.4.4.	Determinación de la VTO.....	51
5.4.5.	Determinación experimental de la VCO método dinámico .....	52
5.4.6.	Determinación experimental de la VCO método dinámico modificado .....	52
5.4.7.	Método de correlación empírica para la determinación de $kLa$ .....	52
5.5.	Determinación de variables .....	54
5.5.1.	Determinación de la velocidad específica de crecimiento de biomasa .....	54
5.5.2.	Determinación de rendimientos.....	54
5.5.3.	Determinación de velocidades específicas.....	55
5.5.4.	Determinación de productividades .....	56
5.5.5.	Determinación de poder viscosificante .....	57
5.5.6.	Determinación de parámetros hidrodinámicos .....	57
5.6.	Equipamiento .....	59
5.6.1.	Descripción del sistema de fermentación .....	59
5.6.2.	Equipos para asegurar condiciones de esterilidad .....	62
5.6.3.	Equipos para la conservación y cultivo celular .....	62
5.6.4.	Equipos de análisis .....	63
5.6.5.	Equipos auxiliares.....	64

<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIONES PRIMER OBJETIVO .....</b>	<b>66</b>
6.1. Producción de alginato a diferentes velocidades de agitación .....	66
6.2. Determinación de la VTO y VCO a diferentes condiciones de hidrodinámica a través del cambio en la velocidad de agitación .....	68
6.3. Influencia de las condiciones hidrodinámicas en la velocidad de consumo de oxígeno .....	75
6.4. Caracterización de la $qO_2$ a diferentes velocidades de agitación a través de pulsos de oxígeno con el fin de evaluar la respiración en la producción de alginato y PHB en cultivos por lotes de <i>A. vinelandii</i> ATCC 9046. ....	77
6.4.1. Implementación de un método experimental para medir la VCO y $qO_2$ mediante pulsos de oxígeno en cultivos por lotes de <i>A. vinelandii</i> . ....	77
6.4.2. Influencia de la $qO_2$ sobre la producción de biomasa y consumo de sacarosa en cultivos por lotes de <i>A. vinelandii</i> a diferentes velocidades de agitación mediante pulsos de oxígeno .....	82
6.4.3. Efecto de la velocidad de agitación sobre producción de PHB en cultivos por lotes de <i>A. vinelandii</i> .....	85
6.4.4. Efecto de la velocidad de agitación sobre la producción de alginato en cultivos por lotes de <i>A. vinelandii</i> .....	88
6.5. Relación entre el efecto de la $qO_{2m\acute{a}x}$ y el crecimiento celular en cultivos por lotes de <i>A. vinelandii</i> .....	91
6.6. Relación entre el efecto de la $qO_2$ y la producción de alginato en cultivos por lotes de <i>A. vinelandii</i> .....	92
<b>7. RESULTADOS Y DISCUSIONES SEGUNDO OBJETIVO .....</b>	<b>95</b>
7.1. Caracterización de la transferencia de oxígeno en biorreactor tanque agitado a través del método físico de desgaseo .....	95
7.2. Efecto comparativo de la velocidad de agitación (100 vs. 900 rpm) sobre el metabolismo de <i>A. vinelandii</i> ATCC 9046.....	97
7.3. Influencia de la velocidad de agitación y/o VTO sobre la TOD, crecimiento, sacarosa y producción de PHB en cultivos por lotes de <i>A. vinelandii</i> ATCC 9046 .....	100
7.4. Efecto de la VTO sobre la producción de alginato, en cultivos por lotes de <i>A. vinelandii</i> ATCC 9046 .....	106
7.5. Determinación de la ecuación estequiométrica para el crecimiento de <i>A. vinelandii</i> ATCC 9046 .....	109
7.5.1. Evolución de la VCO, $qO_2$ y RQ mediante balance estequiométrico durante el crecimiento celular en cultivos por lotes de <i>A. vinelandii</i> .....	112
7.6. Influencia de la VTO sobre el PMP, razón G/M, viscosidad y poder viscosificante de alginato en cultivos por lotes de <i>A. vinelandii</i> .....	114
7.7. Evaluación de la respiración mediante cambios en la velocidad de agitación en cultivos por lotes de <i>A. vinelandii</i> .....	121

7.7.1.	Desarrollo de una correlación empírica tipo modelo potencial para la estimación del <i>kLa</i> en un biorreactor tanque agitado .....	121
7.8.	Influencia de la VTO sobre la morfología celular en cultivos por lotes de <i>A. vinelandii</i> .....	126
7.9.	Relación entre la respiración y la producción de alginato bacteriano .....	128
<b>8.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIONES TERCER OBJETIVO .....</b>	<b>130</b>
8.1.	Producción de biomasa, PHB y consumo de sacarosa a diferentes velocidades de agitación.....	130
8.2.	Efecto de la velocidad de agitación sobre la producción de alginato en cultivos por lotes de <i>A. vinelandii</i> ATCC 9046 .....	137
8.2.1.	Evolución del peso molecular promedio, relación G/M y grado de acetilación del alginato producido a diferentes velocidades de agitación.....	142
8.2.2.	Producción y caracterización de hidrogeles de alginato bacteriano con potencial en biomedicina.....	145
8.2.3.	Pruebas de estabilidad de los hidrogeles de alginato bacteriano .....	151
8.2.4.	Análisis de los alginato e hidrogeles por microscopía electrónica de barrido (SEM):	153
8.3.	Expresión relativa de genes involucrados en la producción de alginato.....	155
8.3.1.	Genes relacionados con la regulación global de la biosíntesis del alginato <i>algU</i> en cultivos por lotes de <i>A. vinelandii</i> ATCC 9046.....	155
8.3.2.	Expresión relativa de genes implicados en la respiración desacoplada y en la fijación de nitrógeno en cultivos por lotes <i>A. vinelandii</i> ATCC 9046 .....	157
8.3.3.	Expresión relativa de genes implicados en el estrés celular en <i>A. vinelandii</i>	162
8.3.4.	Genes involucrados en la polimerización del alginato: <i>alg8</i> y <i>alg44</i> .....	163
8.3.5.	Genes involucrados en la despolimerización del alginato: <i>alyA1</i> , <i>alyA2</i> , <i>alyA3</i> y <i>algL</i>	167
8.3.6.	Genes involucrados en la epimerización del alginato.....	170
8.3.7.	Genes involucrados en la acetilación del alginato .....	172
<b>9.</b>	<b>CONCLUSIÓN.....</b>	<b>177</b>
<b>10.</b>	<b>RECOMENDACIONES Y PROYECCIONES .....</b>	<b>179</b>
<b>11.</b>	<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>180</b>
<b>ANEXOS.....</b>		<b>204</b>
Anexo 1:	Curva de calibrado para la determinación de biomasa .....	204
Anexo 2:	Curva de calibrado para la determinación de sacarosa .....	205
Anexo 3:	Curva de calibrado para la determinación del peso molecular del alginato.....	206
Anexo 4:	Curva de calibrado para la concentración de ácido crotónico .....	207

Anexo 5: Curva de calibrado para la determinación del grado de acetilación .....	208
Anexo 6: Determinación de la correlación empírica de <i>kLa</i> .....	209
<b>PARTICIPACIÓN EN DIFUSION EN EVENTOS CIENTIFICOS .....</b>	<b>211</b>
<b>ARTÍCULOS CIENTIFICOS.....</b>	<b>213</b>
<b>PREMIOS .....</b>	<b>214</b>
<b>ADJUDICACIÓN DE PROYECTOS .....</b>	<b>214</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.1</b> Aplicaciones del alginato.....	8
<b>Tabla 1.2</b> Proteínas involucradas en la biosíntesis de alginato .....	12
<b>Tabla 1.3</b> . Comparación de $qO_2$ en <i>A. vinelandii</i> cultivadas en diferentes condiciones de crecimiento .....	26
<b>Tabla 1.4</b> Valores de $qO_2$ y PMP de alginato en cultivos de <i>A. vinelandii</i> .....	32
<b>Tabla 5.1</b> Composición de medio de cultivo para <i>A. vinelandii</i> ATCC 9046 .....	40
<b>Tabla 5.2</b> Diseño de cebadores para la expresión génica por qPCR en tiempo real.....	48
<b>Tabla 5.3</b> Dimensiones geométricas del biorreactor .....	59
<b>Tabla 6.1</b> Crecimiento celular y producción de alginato en cultivos por lotes de <i>A. vinelandii</i> realizados a diferentes velocidades de agitación .....	66
<b>Tabla 6.2</b> Estimación de la $VTO_{m\acute{a}x}$ utilizando $kLa$ por método dinámico sin células .....	70
<b>Tabla 6.3</b> Estimación de la potencia gaseada ( $P_g$ ), energía promedio ( $\epsilon_{promedio}$ ), microescala de turbulencia de Kolmogorov ( $\lambda_s$ ), velocidad de la punta de impulsor ( $vpunta$ ), velocidad de corte ( $\gamma_{promedio}$ , $\gamma_{m\acute{a}xima}$ ) y esfuerzo cortante ( $\tau t$ ).....	75
<b>Tabla 6.4</b> Efecto de la velocidad de agitación sobre $m$ , $Y_{x/s}$ y $q_s$ en cultivos por lotes de <i>A. vinelandii</i> ATCC 9046 con pulsos de oxígeno. ....	84
<b>Tabla 6.5</b> Efecto de la velocidad de agitación en la producción de PHB en cultivos por lotes de <i>A. vinelandii</i> ATCC 9046 en biorreactor de 3 L con pulsos de oxígeno .....	87
<b>Tabla 6.6</b> Efecto de la velocidad de agitación en la producción de alginato en cultivos por lotes de <i>A. vinelandii</i> ATCC 9046 en un biorreactor de 3L con pulsos de oxígeno .....	89
<b>Tabla 7.1</b> Estimación de la $VTO_{m\acute{a}x}$ utilizando $kLa$ por método dinámico sin células.....	97
<b>Tabla 8.1</b> Parámetros de cultivo ( $m$ , $Y_{x/s}$ y $q_s$ ) obtenidos en cultivos por lotes de <i>A. vinelandii</i> a diferentes velocidades de agitación. ....	133
<b>Tabla 8.2</b> Parámetros de fermentación ( $Y_{PHB/s}$ y $Q_{PHB}$ ) obtenidos en cultivos por lotes de <i>A. vinelandii</i> a diferentes velocidades de agitación.....	134
<b>Tabla 8.3</b> Comparación de los valores de $qO_{2m\acute{a}x}$ en ambos reactores utilizados mediante dos métodos de determinación diferentes .....	137
<b>Tabla 8.4</b> Parámetros de fermentación ( $Y_{Alg/X}$ , $Y_{Alg/s}$ , $Q_{Alg}$ y $q_{Alg}$ ) obtenidos mediante cultivos por lotes de <i>A. vinelandii</i> ATCC 9046.....	139
<b>Tabla 8.5</b> Caracterización de alginatos bacterianos extraídos a diferentes velocidades de agitación en cultivo por lotes de <i>A. vinelandii</i> .....	146

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1</b> Estructura química del alginato bacteriano. Residuos de ácido manurónico (M) y ácido gulurónico (G) en la molécula. ....	2
<b>Figura 1.2</b> Estructura molecular del alginato que muestra los sitios de unión para cationes divalentes. Los círculos rojos representan cationes. (C: catión; G: ácido $\alpha$ -L-gulurónico; M: ácido $\beta$ -D-manurónico).....	4
<b>Figura 1.3</b> Métodos de modificación física, química y biológica del alginato.....	6
<b>Figura 1.4</b> Microfotografía electrónica de <i>A. vinelandii</i> con PHB intracelular acumulado (A) y rodeada de alginato (B).....	10
<b>Figura 1.5</b> Biosíntesis de PHB.....	11
<b>Figura 1.6</b> . Representación esquemática de la biosíntesis de alginato en <i>A. vinelandii</i> .....	12
<b>Figura 1.7</b> Representación esquemática de la regulación del alginato en <i>A. vinelandii</i> .....	20
<b>Figura 1.8</b> Esquema de las cadenas respiratorias acoplada y desacoplada, de <i>A. vinelandii</i> . .....	25
<b>Figura 1.9</b> Perfil característico de TOD y VTO en cultivos de <i>A. vinelandii</i> .....	28
<b>Figura 1.10</b> Relación entre $VCO_{m\acute{a}x}$ y el peso molecular de alginato en cultivos de <i>A. vinelandii</i> .....	31
<b>Figura 1.11</b> Relación entre $qO_2$ y el peso molecular máximo de alginato en cultivos de <i>A. vinelandii</i> .....	33
<b>Figura 1.12</b> Efecto teórico de la velocidad de agitación o aireación sobre la VCO en un Bioprocesos .....	35
<b>Figura 5.1</b> Esquema representativo de formación de hidrogeles de alginato con reticulación iónica. ....	49
<b>Figura 5.2</b> Esquema de estabilidad de hidrogeles de alginato.....	50
<b>Figura 5.3</b> Esquema del montaje del sistema de reactor y equipos auxiliares. ....	60
<b>Figura 5.4</b> Representación de biorreactor Sartorius BBI Systems, modelo BIOSTAT® B plus: estación de control conectada a un reactor de 2 L. Esquema del biorreactor de Sartorius señalando sus componentes.....	61
<b>Figura 5.5</b> Esquema de la instalación de Sartorius BBI Systems, modelo BIOSTAT® B plus: estación de control conectado a dos biorreactores de 2 L.....	61
<b>Figura 6.1</b> Curvas de desorción y absorción para la determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ( $k_L a$ ) mediante el método dinámico sin células. ....	68
<b>Figura 6.2</b> Resultado de aplicación de método dinámico con células para la determinación de la VCO en cultivos de <i>A. vinelandii</i> en biorreactor de 3-L a 500 rpm, 30°C y 1 vvm. ....	72
<b>Figura 6.3</b> Efecto de la velocidad de agitación sobre la VCO .....	73

<b>Figura 6.4</b> Efecto de la velocidad de agitación sobre la $qO_2$ .....	74
<b>Figura 6.5</b> Perfil de TOD en cultivos con pulsos de oxígeno de <i>A. vinelandii</i> cultivados en biorreactor de 3 L a 500 rpm, 30°C y 1 vvm. ....	78
<b>Figura 6.6</b> Perfil de VCO y $qO_2$ a diferentes tiempos de cultivo 8, 16, 24, y 48 h de cultivo en cultivos por lotes de <i>A. vinelandii</i> realizados en un biorreactor de 3 L a diferentes velocidades de agitación (200, 300, 400, 500 y 600 rpm) utilizando pulsos de oxígeno.....	79
<b>Figura 6.7</b> Perfil de la producción de biomasa sin PHB (a) y consumo de sacarosa (b) en cultivos por lotes de <i>A. vinelandii</i> realizados en un biorreactor de 3 L a diferentes velocidades de agitación con pulsos de oxígeno. ....	83
<b>Figura 6.8</b> Perfil de acumulación de PHB (a) y producción de PHB (b) en cultivos por lotes de <i>A. vinelandii</i> realizados en un biorreactor de 3 L a diferentes velocidades de agitación con pulsos de oxígeno.....	86
<b>Figura 6.9</b> Perfil de producción de alginato (a) y peso molecular promedio de alginato(b) en cultivos por lotes de <i>A. vinelandii</i> realizados en un biorreactor de 3L a diferentes velocidades de agitación con pulsos de oxígeno. ....	88
<b>Figura 6.10</b> Relación entre la $qO_{2m\acute{a}x}$ , $\square$ y $biomasa_{m\acute{a}x}$ en cultivos por lotes con pulsos de oxígeno de <i>A. vinelandii</i> a diferentes velocidades de agitación. ....	91
<b>Figura 6.11</b> Relación entre la producción de alginato y $qO_{2m\acute{a}x}$ en cultivos por lotes con pulsos de oxígeno de <i>A. vinelandii</i> a diferentes velocidades de agitación. ....	92
<b>Figura 7.1</b> Curvas de desorción y absorción para la determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ( $k_La$ ) mediante el método dinámico sin células. ....	96
<b>Figura 7.2</b> Evolución de la concentración de biomasa, sacarosa, alginato, PHB y TOD en cultivos por lotes de <i>A. vinelandii</i> ATCC9046 a 100 rpm y flujo de aire de 1,5 L min <sup>-1</sup> .....	99
<b>Figura 7.3</b> Evolución de la concentración de biomasa, sacarosa, alginato, PHB y TOD en cultivos por lotes de <i>A. vinelandii</i> ATCC 9046 a 900 rpm y flujo de aire de 1,5 L min <sup>-1</sup> .....	99
<b>Figura 7.4</b> Evolución de la TOD en cultivos por lotes de <i>A. vinelandii</i> ATCC 9046 realizados en un biorreactor de 2 L a diferentes velocidades de agitación. ....	101
<b>Figura 7.5</b> Perfil de la biomasa (a), la sacarosa (b) producción de PHB (c) y acumulación de PHB (d) en cultivos por lotes de <i>A. vinelandii</i> ATCC 9046 realizados en un biorreactor de 2-L a diferentes velocidades de agitación. ....	102
<b>Figura 7.6</b> Perfil de la producción de alginato en cultivos por lotes de <i>A. vinelandii</i> ATCC 9046 realizados a diferentes velocidades de agitación. ....	106
<b>Figura 7.7</b> Evolución de la VCO (a), $qO_2$ (b) y RQ (c) durante el crecimiento celular en cultivos por lotes de <i>A. vinelandii</i> ATCC 9046 en un biorreactor de 2 L a diferentes velocidades de agitación. ....	113

<b>Figura 7.8</b> Evolución del peso molecular promedio de alginato (a) y razón G/M (b) en cultivos por lotes de <i>A. vinelandii</i> ATCC 9046 realizados en un biorreactor de 2 L a diferentes velocidades de agitación.....	115
<b>Figura 7.9</b> Evolución de la viscosidad en cultivos por lotes de <i>A. vinelandii</i> ATCC 9046 realizados en un biorreactor de 2 L a diferentes velocidades de agitación.....	117
<b>Figura 7.10</b> Perfil de poder viscosificante en cultivos por lotes de <i>A. vinelandii</i> ATCC 9046 realizados en un biorreactor de 2 L a diferentes velocidades de agitación.....	118
<b>Figura 7.11</b> Relación entre el exponente del poder viscosificante y $VTO_{m\acute{a}x}$ en cultivos por lotes de <i>A. vinelandii</i> ATCC 9046 realizados en un biorreactor de 2-L a diferentes velocidades de agitación. ....	120
<b>Figura 7.12</b> Evolución del $k_L a$ , VTO y $qO_2$ en cultivos por lotes de <i>A. vinelandii</i> ATCC 9046 realizados en un biorreactor de 2 L a diferentes velocidades de agitación.....	123
<b>Figura 7.13</b> Micrografía de SEM de células de <i>A. vinelandii</i> a diferentes tiempos de cultivo (8, 24 y 72 h) y a diferentes velocidades de agitación. Todas las imágenes fueron realizadas con un aumento original de 7000X y la barra de escala representa 8 $\mu m$ .....	126
<b>Figura 7.14</b> Relación entre la producción de alginato $_{m\acute{a}x}$ y $RQ_{m\acute{a}x}$ (a), $PMP_{m\acute{a}x}$ de alginato y $qO_{2m\acute{a}x}$ (b) en cultivos por lotes de <i>A. vinelandii</i> ATCC 9046 realizados en un biorreactor de 2 L a 100, 300, 500, 700 y 900 rpm.....	129
<b>Figura 8.1</b> Evolución del crecimiento celular (a) sacarosa (b), PHB (c y d) en cultivos de <i>A. vinelandii</i> ATCC 9046 en un biorreactor de 3 L a 100, 300, 500, 700 y 900 rpm.....	131
<b>Figura 8.2</b> Evolución de los perfiles de la TOD (a) y $qO_2$ (b) en cultivo por lotes de <i>A. vinelandii</i> a en un biorreactor de 3 L a 100, 300, 500, 700 y 900 rpm. ....	136
<b>Figura 8.3</b> Perfil de la producción de alginato en cultivos por lotes de <i>A. vinelandii</i> ATCC 9046 realizados a diferentes velocidades de agitación. ....	138
<b>Figura 8.4</b> Relación entre la producción de alginato $_{m\acute{a}x}$ , $q_{Alg}$ , producción de $PHB_{m\acute{a}x}$ y $qO_{2m\acute{a}x}$ a diferentes velocidades de agitación en cultivos por lotes de <i>A. vinelandii</i> ATCC 9046 en biorreactor de 3 L.....	140
<b>Figura 8.5</b> Perfil de caracterización de alginato: PMP (a) relación G/M (b) y grado de acetilación (c) en cultivos por lotes de <i>A. vinelandii</i> realizados a diferentes velocidades de agitación (100, 300, 500, 700 y 900 rpm).....	143
<b>Figura 8.6</b> Formación de hidrogeles de alginato bacteriano luego de 24 h de reticulación iónica. ....	151
<b>Figura 8.7</b> Estabilidad hidráulica de hidrogeles de alginato bacteriano luego de 250 horas. ....	152
<b>Figura 8.8</b> Microscopia electrónica de barrido (SEM) de alginatos bacterianos, peso molecular bajo (LMW) (a) peso molecular medio (MMW) (b) y peso molecular alto (HMW) (c). ....	153

<b>Figura 8.9</b> Microscopia electrónica de barrido (SEM) de los hidrogeles de alginato bacteriano sometidos a pruebas de estabilidad hidráulica a 100 y 50 $\mu\text{m}$ . peso molecular medio (MMW) (a y b) y peso molecular alto (HMW) (c y d). .....	154
<b>Figura 8.10</b> Perfil de expresión relativa de genes involucrados en la regulación global de la biosíntesis de alginato ( <i>algU</i> ), a diferentes tiempos de cultivos (24, 48 y 72 h) en cultivos por lotes de <i>A. vinelandii</i> a diferentes velocidades de agitación. ....	156
<b>Figura 8.11</b> Perfil de expresión relativa de genes involucrados en la respiración y fijación de nitrógeno a diferentes tiempos de cultivos (24, 48 y 72 h) en cultivos por lotes de <i>A. vinelandii</i> a diferentes velocidades de agitación. ....	158
<b>Figura 8.12</b> Perfil de expresión relativa de genes involucrados en el estrés celular ( <i>rpoS</i> ), a diferentes tiempos de cultivos (8, 24, 48 y 72 h) en cultivos por lotes de <i>A. vinelandii</i> a diferentes velocidades de agitación. ....	162
<b>Figura 8.13</b> Perfiles de expresión relativa de genes involucrados en la polimerización, a diferentes tiempos de cultivos (24, 48 y 72 h) en cultivos por lotes de <i>A. vinelandii</i> a diferentes velocidades de agitación. ....	164
<b>Figura 8.14</b> Perfiles de expresión relativa de genes involucrados en la despolimerización del alginato a diferentes tiempos de cultivos (24, 48 y 72 h) en cultivos por lotes de <i>A. vinelandii</i> a diferentes velocidades de agitación. ....	167
<b>Figura 8.15</b> Perfil de expresión relativa de genes involucrados en la epimerización del alginato ( <i>algE7</i> ), a diferentes tiempos de cultivos (24, 48 y 72 h) en cultivos por lotes de <i>A. vinelandii</i> a diferentes velocidades de agitación. ....	170
<b>Figura 8.16</b> Perfil de expresión relativa de genes involucrados en la acetilación del alginato ( <i>algV</i> ) a diferentes tiempos de cultivos (24, 48 y 72 h) en cultivos por lotes de <i>A. vinelandii</i> a diferentes velocidades de agitación. ....	172
<b>Figura 8.17</b> Representación esquemática de respuestas moleculares moduladas por la velocidad de agitación en fase de crecimiento (24 horas) en cultivos por lotes de <i>A. vinelandii</i> . ....	174

# 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

## 1.1. Generalidades del alginato

Los alginatos son polisacáridos que se encuentran en las algas pardas, compuestos principalmente por polímeros lineales de ácidos  $\beta$ -(1-4)-D-manurónico (M) y  $\alpha$ -L-gulurónico (G), que son diferentes en términos de sus proporciones y disposiciones lineales (Ahmad et al., 2021). La secuencia de monómeros (M, G) cambia mucho dependiendo de la fuente (Donati et al., 2003). El alginato se encuentra presente de forma natural en las paredes celulares de varias especies de algas pardas, constituyendo hasta el 40% de la biomasa (Fertah et al., 2017; Helmiyati & Aprilliza, 2017; Larsen et al., 2003). Generalmente, los procesos de extracción y purificación de alginatos se basan en la conversión de la forma insoluble en las paredes celulares de las algas a la soluble, normalmente por la sal sódica, seguida de sucesivas disoluciones y precipitaciones para eliminar impurezas (Rinaudo, 2008).

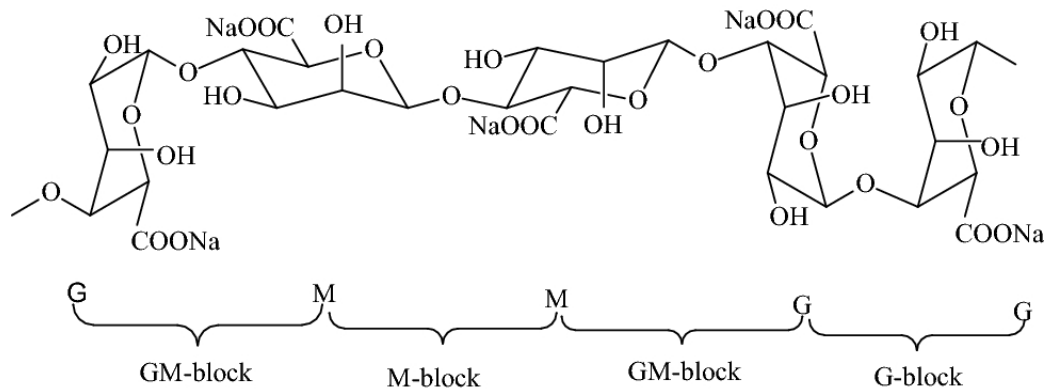
El alginato puede ser utilizado en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética debido a su alta biocompatibilidad y ventajosas propiedades físico-químicas, que impulsan su uso como agente estabilizador y viscosificante, además de la capacidad de formar un hidrogel fuerte y estable al interactuar con iones divalentes como el calcio (Sahoo & Biswal, 2021; Kanasan et al., 2017; Agarwal et al., 2016; Hoefler et al., 2015). Dentro de las aplicaciones, se puede destacar que alginato puede ser utilizado como matriz para encapsular y liberar fertilizantes y también para la síntesis de superabsorbentes (Rashidzadeh et al., 2015; Zhang et al., 2014).

Actualmente, el alginato comercial se extrae de *Laminaria*, *Macrocystis*, *Lessonia*, *Eclonia* y *Durvillea* (Pawar & Edgar, 2012), pero puede ser también producido por bacterias del género *Azotobacter* (Bonartseva et al., 2017; Clementi, 1997) y *Pseudomonas* (Jain & Ohman, 2005; Leid et al., 2005).

### 1.1.1. Estructura del alginato

El alginato es el único polisacárido natural que contiene grupos carboxilo en cada residuo componente y consta de dos residuos isoméricos, ácido  $\beta$ -D-manurónico (M) y ácido

$\alpha$ -L-gulurónico (G), que están conectados linealmente por enlaces glucosídicos 1  $\rightarrow$  4 para formar tres bloques diferentes: bloque poli-MM, bloque poli-GG y bloque poli-MG (Martău et al., 2019). como se muestra en la Figura 1.1. La relación G/M o M/G, la disposición de los bloques y el peso molecular determinan predominantemente sus diferencias estructurales al tiempo que imparten propiedades físicas y químicas específicas (Sanchez-Ballester et al., 2021).



**Figura 1.1** Estructura química del alginato bacteriano. Residuos de ácido manurónico (M) y ácido gulurónico (G) en la molécula (Sahoo & Biswal, 2021).

Estos monómeros se distribuyen en bloques continuos de residuos de ácido manurónico (bloques M), residuos de ácido gulurónico (bloques G) o residuos alternados (bloques MG)(Hay et al., 2013; Pawar & Edgar, 2012). Al comparar estos polímeros extraídos de diferentes fuentes, se observa que difieren en el contenido de la razón G/M o M/G como también en el largo de cada bloque, debido a esto han sido elaborados más de 200 alginatos diferentes (Lee & Mooney, 2012; Tønnesen & Karlsen, 2002).

### 1.1.2. Propiedades físicas del alginato

Dentro de las principales propiedades físicas, el alginato es soluble en agua, pero insoluble en disolventes orgánicos. Cuando el alginato se disuelve en agua, se forma una solución viscosa, y el volumen puede aumentar 10 veces después de la absorción de agua. La viscosidad de la solución de alginato está influenciada principalmente por la concentración y el grado de polimerización. Por lo general, la concentración de alginato está en un rango de 1 - 10% p p<sup>-1</sup> (Guo et al., 2020).

La solubilidad del alginato se ve afectada principalmente por cuatro parámetros:

(1) Distribución de bloques de G y M: El alginato con un alto contenido de bloques GG presenta una mayor solubilidad en agua que aquellos con un alto contenido de bloques MM. Sin embargo, a pH bajo, los alginatos con una mayor proporción de bloques MG/GM son solubles, mientras que los ricos en bloques MM o GG tienden a ser insolubles (J. Liu et al., 2019).

(2) Valor de pH del disolvente: Es esencial disolver el alginato en un disolvente con un pH superior al valor óptimo (pH = 6,8), lo que permite la desprotonación de los grupos ácido carboxílico (Gutsche et al., 2008).

(3) Fuerza iónica: La solubilidad del alginato generalmente aumenta con el aumento de la fuerza iónica del sistema (excepto los iones gelificantes), porque la alta fuerza iónica puede contraer cadenas moleculares por efecto de blindaje electrostático, disminuir el enrollamiento de la cadena y la viscosidad del sistema (Demircan & Oral, 2023).

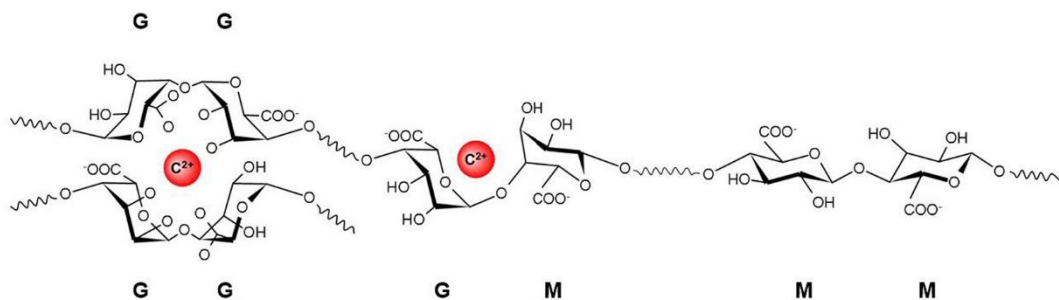
(4) Presencia de iones gelificantes: Para lograr una disolución adecuada del alginato, es fundamental utilizar un disolvente acuoso libre de iones reticulantes (agentes de entrecruzamiento), ya que este polímero puede formar geles en presencia de cationes gelificantes como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$  o  $\text{Sr}^{2+}$ . Además, cuando los grupos ácido carboxílico del alginato están protonados, el polímero no puede dispersarse completamente en ningún medio, incluidos los sistemas acuosos (Pawar & Edgar, 2012).

Además, el alginato tiene la capacidad de formar geles, y está principalmente influenciado por la coordinación del número de cationes. Se cree que el papel de los cationes en los geles de alginato es el blindaje de la repulsión electrostática de grupos aniónicos como el carboxilo y la unión directa por enlaces iónicos. Otros factores específicos también parecen influir en la gelificación del alginato, pero son relativamente débiles, como la temperatura, el pH y la interacción hidrofóbica (Puguan et al., 2014).

La gelificación inducida por iones es una de las propiedades funcionales más importantes del alginato y es la razón detrás de muchas aplicaciones favorables del alginato. El mecanismo general de gelificación del alginato es bien conocido como el modelo de "caja de huevos", que fue propuesto por Grant et al., 1973) para describir la gelificación del alginato mediada por  $\text{Ca}^{2+}$ . El alginato también puede formar geles a través de la gelificación inducida por iones con otros cationes divalentes o multivalentes como  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,

Zn<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Al<sup>3+</sup>, Fe<sup>3+</sup> (Lu et al., 2019; Thakur et al., 2018). Los geles de alginato formados con estos cationes muestran similitudes y diferencias en su mecanismo de gelificación, resistencia del gel, viscoelasticidad y biocompatibilidad.

Los iones divalentes son el agente más comúnmente utilizado para inducir la formación de gel de alginato. Los grupos carboxilo en el alginato (principalmente residuos G) pueden reticular con iones divalentes como Ca<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup> o cualquier otro catión divalente para formar hidrogeles excepto Mg<sup>2+</sup> y Hg<sup>2+</sup> (Draget et al., 1994) como se muestra en la Figura 1.2.



**Figura 1.2** Estructura molecular del alginato que muestra los sitios de unión para cationes divalentes. Los círculos rojos representan cationes. (C: catión; G: ácido α-L-gulurónico; M: ácido β-D-manurónico) (Hu et al., 2021).

Se ha estudiado que los monómeros presentes en las cadenas de alginato pueden presentar las siguientes modificaciones: (i) acetilación, y (ii) epimerización, además es importante mencionar que existe un (iii) control del largo de la cadena del alginato lo que se expresa a través del peso molecular de ésta. El alginato tiene propiedades viscosificantes y gelificantes que dependen de sus características estructurales (Zhang et al., 2021; Pawar & Edgar, 2012; Remminghorst & Rehm, 2006). Estas características están determinadas en gran medida por la condiciones de crecimiento y el tiempo de cultivo (Khanra et al., 2018; Jiménez et al., 2016; Goh et al., 2012).

La acetilación del alginato ocurre exclusivamente en los residuos M seleccionados al azar de la cadena (no todos los bloques M son acetilados). El sitio primario para la acetilación involucra al grupo hidroxilo del carbono 2, pero además puede ser acetilado el grupo hidroxilo del carbono 3 (o ambos) obteniéndose posteriormente un residuo 2,3-di-O-acetilmanurónico. Se sabe que el acetil-CoA es la fuente directa de acetato para las modificaciones del alginato. Se ha reportado que el grado de O-acetilación del alginato se encuentra en un rango entre 2 a 57 % p p<sup>-1</sup>, siendo dependiente de la cantidad de residuos M presentes en el polímero, de la fuente de la cual se obtenga y de la disponibilidad de nutrientes. Lee y Day (1998)

reportaron que limitaciones de nitrógeno causan un aparente incremento en los niveles de O-acetilación del alginato. La acetilación incrementa la capacidad de hinchazón (al formar geles), la viscosidad y la asociación intermolecular. El rol que cumple la acetilación en las cadenas de alginato ha sido asociado a la protección de los residuos M ante la epimerización a residuos G, además la presencia de estos grupos acetil generan un control ante la actividad de alginato liasas (Windhues & Borchard, 2003; Clarke et al., 2002, 2002; J. W. Lee & Day, 1998; Skjåk-Bræk et al., 1986, 1985).

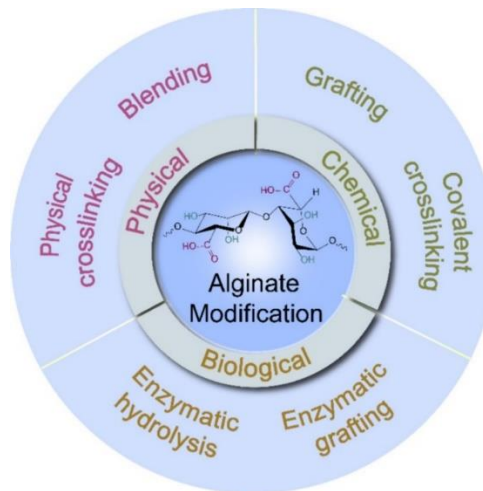
Independiente de la fuente de la cual se obtenga el alginato, los residuos M que no han sido acetilados pueden ser epimerizados a residuos G. Esta modificación puede ser mediada por más de un tipo de epimerasa, lo que genera alginatos ricos en bloques G, los que tienen la capacidad de formar geles más fuertes. El nivel de epimerización de las moléculas de azúcar es una modificación que raramente se encuentra en la naturaleza, sólo han sido reportado tres polisacáridos en los que ocurre este proceso: el alginato y dos tipos de glicosaminaglicano (Wolfram et al., 2014; Pawar & Edgar, 2012; Svanem et al., 2001; Valla et al., 2001; Franklin et al., 1994). Como se mencionó anteriormente, las enzimas no epimerizan residuos M acetilados, por lo que el porcentaje de acetilación podría determinar el grado final de epimerización, y con ello las propiedades finales del alginato (Ertesvåg et al., 2009). Por otra parte se sabe que, el contenido de bloque G de los tallos de *L. hyperborean* es del 60% y el de otros alginatos disponibles comercialmente está en el rango de 14 a 31% (Schipani et al., 2020). Otra característica clave es su peso molecular, ya que alginatos de mayor peso molecular generan soluciones más viscosas y geles con mejores propiedades físicas (Yong et al., 2012; LeRoux et al., 1999

### **1.1.3. Propiedades biológicas del alginato**

El alginato es un polisacárido no tóxico y biocompatible aprobado por la FDA ampliamente utilizado en varias aplicaciones médicas, incluidos agentes espesantes y estabilizadores y apósitos para heridas (Hurtado et al., 2022). Se ha demostrado que los compuestos de alginato pueden promover el crecimiento dirigido, la proliferación y la adhesión de células, así como promover la expresión de algunos genes (Wu et al., 2021).

El alginato es rico en grupos carboxilo y se cree que sus propiedades polianiónicas desempeñan un papel crucial en la actividad antibacteriana y antiviral. Su efecto bactericida contra las bacterias Gram-negativas es más robusto que el de las bacterias Gram-positivas, mientras que la actividad antibacteriana depende de su concentración, iones de reticulación,

carga neta, hidrofiliidad y el organismo de prueba (Hoque et al., 2023). El alginato también posee otras propiedades biológicas como actividad antitumoral, propiedades bioadhesivas y permeabilidad superficial biológica como se muestra en la Figura 1.3. Debido a esto, el alginato, se ha utilizado ampliamente en el campo de la biomedicina (Cano-Vicent et al., 2023).



**Figura 1.3** Métodos de modificación física, química y biológica del alginato (Li et al., 2024).

## 1.2. Aplicaciones del alginato

El alginato es un biopolímero muy conocido con amplias aplicaciones en diferentes industrias. Tradicionalmente, la aplicación del alginato estaba orientada por su capacidad viscosificante y gelificante en la industria alimentaria. Durante los últimos años, nuevos desarrollos en las industrias biomédica, farmacológica y cosmética han llamado la atención sobre la gran importancia de los biopolímeros. En este contexto, el alginato ha emergido como un recurso útil en el desarrollo de nuevas tecnologías, siendo más relevante como parte de nuevos sistemas de administración de fármacos y en el desarrollo de dispositivos biomédicos (Tomić et al., 2023).

El uso del alginato como biomaterial para el desarrollo de dispositivos biomédicos está estrechamente ligado a sus propiedades gelificantes. Aunque la forma más sencilla de generar hidrogeles de alginato es utilizar cationes divalentes para su reticulación, diferentes estudios han propuesto nuevas técnicas de modificación química o el uso de mezclas con otros polímeros para aumentar el grado de reticulación entre cadenas de alginato, y favorecer así la obtención de hidrogeles más rígidos.

Hoefler et al., (2015) evaluaron el uso de la producción de alginato bacteriano y su comparación como biomaterial para la formulación de apósitos para heridas. El alginato bacteriano obtenido presentó un mayor peso molecular, una mayor relación G/M y un alto grado de acetilación ( $> 50\%$  p p<sup>-1</sup>) en comparación con el alginato de algas, lo que explica la mayor capacidad de retención de agua y estabilidad física en los hidrogeles elaborados con alginato bacteriano (Hoefler et al., 2015). Rashidzadeh et al.,(2020) desarrollaron perlas de hidrogel antibacterianas a base de alginato con respuesta de administración magnética de fármacos debido a la inclusión de óxido ferroférico (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) y nanopartículas de plata (Ag), que presentaron una alta actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (Rashidzadeh et al., 2020).

En un contexto farmacológico, los alginatos han atraído la atención como materia prima para muchas aplicaciones (Sanchez-Ballester et al., 2021). Los oligosacáridos de alginato se han considerado compuestos bioactivos con una amplia actividad biológica, como propiedades antihipertensivas, hipolipidémicas, inmunorreguladoras e hipoglucémicas, entre otras posibles aplicaciones (Xing et al., 2020). Un estudio clínico demostró que la administración oral diaria de 10 mg de oligosacárido de alginato de 1 kDa redujo la progresión del osteosarcoma al mejorar las capacidades antiinflamatorias y antioxidantes de los pacientes, aliviando la inflamación relacionada con el cáncer (Chen et al., 2017).

Además, la aplicación del alginato en la industria farmacéutica se utiliza más ampliamente como desintegrante en comprimidos, aglutinante de comprimidos, enmascaradores de sabor y como matrices de liberación controlada en comprimidos blandos (Sanchez-Ballester et al., 2021). En este caso, la estructura primaria del alginato se convierte en un determinante de su capacidad de liberación de fármacos. Se ha descrito que en el tampón de fosfato la liberación de maleato de clorfenamina y metronidazol es mayor en comprimidos de alginato ricos en M. Por el contrario, los alginatos ricos en G presentan una mayor tasa de liberación del fármaco en medios ácidos (Liew et al., 2006).

Estos estudios refuerzan la necesidad de obtener alginatos de alta calidad con composición química conocida y baja presencia de contaminantes para sus aplicaciones en industrias más tecnológicas como las formulaciones farmacéuticas o la fabricación de dispositivos biomédicos. Los requisitos de estas industrias no pueden satisfacerse utilizando alginato de algas como materia prima, ya que sus características químicas se pierden comúnmente durante los procesos de separación y purificación (Bojorges et al., 2023). Por lo tanto, han surgido otras alternativas como oportunidades para obtener alginatos hechos a

medida, como la modificación estructural impulsada por enzimas y la producción bacteriana (Moradali et al., 2018, 2017).

Por otra parte, su principal disponibilidad comercial puede ser aplicada con diversas funciones tales las cuales se presentan en la Tabla 1.1 (Vásquez-Ponce et al., 2017).

**Tabla 1.1** Aplicaciones del alginato

<b>Aplicación</b>	<b>Función alginato</b>	<b>Referencia</b>
Aplicaciones alimentarias	Es utilizado como sal de sodio para controlar la viscosidad y como un recubrimiento en los alimentos para minimizar el deterioro. Películas y recubrimientos comestibles a base de alginato para aplicaciones de envasado de alimentos	(Gheorghita Puscaselu et al., 2020; Qin et al., 2018; Senturk Parreidt et al., 2018; Tavassoli-Kafrani et al., 2016).
Aplicaciones farmacéuticas	Se utilizan como portadores para suministrar medicamentos y formulación de fármacos.	(Wróblewska-Krepsztul et al., 2019; Szekalska et al., 2016a; Y. Zhang et al., 2011)
Aplicaciones para el apósito de la herida	Los apósitos de alginato en forma seca absorben el líquido de la herida para humectarla y minimizar así la infección.	(Peng et al., 2022; Varaprasad et al., 2020; K. Y. Lee & Mooney, 2012a).
Aplicaciones en cultivos celulares	Se usan geles de alginato para los sistemas de cultivo de células 2-D y 3-D.	(Dhamecha et al., 2019; Andersen et al., 2015; Huebsch et al., 2010).
Aplicaciones de regeneración tisular	Los alginatos se consideran excelentes materiales para la adhesión celular.	(Krishna & Sankar, 2023; Sun & Tan, 2013; Silva & Mooney, 2010).

En las últimas décadas el uso del alginato se ha enfocado principalmente hacia el área biomédica en donde se utiliza como material biocompatible para el tratamiento y regeneración

de diversos tejidos, vasos sanguíneos, huesos, entre otros. Para esto es necesario disponer de un alginato de composición conocida y propiedades controladas.

En la actualidad, la extracción de algas marinas es la única manera económica de producir alginato. Sin embargo, estos alginatos no cumplen los requisitos para algunas aplicaciones específicas en el campo farmacéutico, donde son necesarios polímeros de composición muy definida en cuanto a peso molecular y composición de ácido manurónico (M) y el ácido gulurónico (G). Es por ello por lo que, se ha demostrado que existe un microorganismo capaz de producir alginato llamado *Azotobacter vinelandii*, el cual ofrece la ventaja de condiciones de producción bien definidas, pero todavía es necesario identificar el efecto de las condiciones de cultivo sobre la síntesis del alginato producido para producirlo a escala industrial. Estas características, como se ha comentado dependen en gran medida del peso molecular, la variación secuencial y la longitud de los bloques de ácido manurónico (M) y su epímero el ácido gulurónico (G) y el grado de acetilación de alginato.

### **1.3. Características generales de *Azotobacter vinelandii***

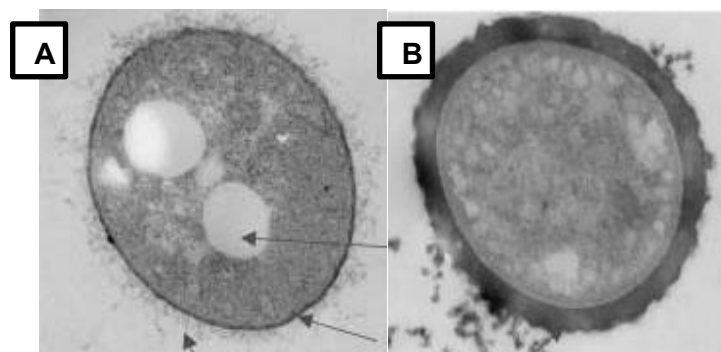
*Azotobacter vinelandii* pertenece a la familia de las bacterias *Azotobacteriaceae*, es una bacteria aerobia estricta, Gram negativa, que tiene la capacidad de fijar nitrógeno debido a que posee un complejo enzimático con actividad nitrogenasa, el cual es sensible al oxígeno (Noar & Bruno-Bárcena, 2018; Kuhla & Oelze, 1988a). Dentro sus características se encuentra, que puede formar quistes resistentes a la desecación (Martínez-Ortiz et al., 2020), producción de polihidroxialcanoatos (PHA) como polímeros de almacenamiento (Mok et al., 2021) y competencia natural. Los microorganismos poseen una morfología celular es pleomórfica, variando dependiendo del estado fisiológico y las condiciones de crecimiento (Patil et al., 2020; Noar & Bruno-Bárcena, 2018). También se conoce que, tiene tres versiones de nitrogenasa con diferentes metales en sus cofactores centrales. (Martin del Campo et al., 2022). Se sabe que, estas enzimas pueden suplirse una por otra para permitir el crecimiento cuando uno u otro metal esencial está ausente (Bellenger et al., 2011; Maynard et al., 1994). Cabe destacar que, cuando se encuentra en condiciones de limitación de hierro, puede producir compuestos sideróforos (McRose et al., 2017).

*Azotobacter vinelandii* es capaz de metabolizar una amplia gama de sustratos de carbono, entre los que se incluyen alcoholes, ácidos orgánicos y azúcares. Sin embargo, presenta una preferencia por determinados compuestos, lo que se manifiesta en un patrón

de crecimiento diaúxico. Esta flexibilidad sugiere el potencial de utilizar sustratos de carbono no refinados y de bajo costo en aplicaciones biotecnológicas (Andler et al., 2023).

*A. vinelandii* posee diversas aplicaciones biotecnológicas debido a que produce dos moléculas de interés industrial: el polisacárido extracelular alginato y el polímero intracelular poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB). El PHB es una fuente de reserva de carbono y energía, y es acumulado intracelularmente durante el crecimiento desbalanceado de la bacteria (Senior & Dawes, 1973), adicionalmente es considerado de interés comercial como material plástico ya que es un arquetipo de termoplástico natural biodegradable con características físicas y químicas similares a los plásticos obtenidos por procesos petroquímicos, tal como el polietileno y el polipropileno (Pyla et al., 2009).

Por otro lado, el alginato es sintetizado durante el proceso de enquistamiento como un mecanismo de resistencia frente a la desecación bajo condiciones ambientales adversas. Asimismo, actúa como una barrera protectora frente a metales pesados y como un sistema de intercambio iónico con alta afinidad por el calcio (Flores et al., 2015). Adicionalmente, el alginato funciona como una barrera que limita la difusión de oxígeno, restringiendo su transferencia y protegiendo de esta manera al complejo nitrogenasa (Sabra et al., 2000b). A continuación, en la Figura 1.4 se presenta la bacteria *Azotobacter vinelandii* produciendo el poliéster intracelular PHB y el exopolisacárido alginato.



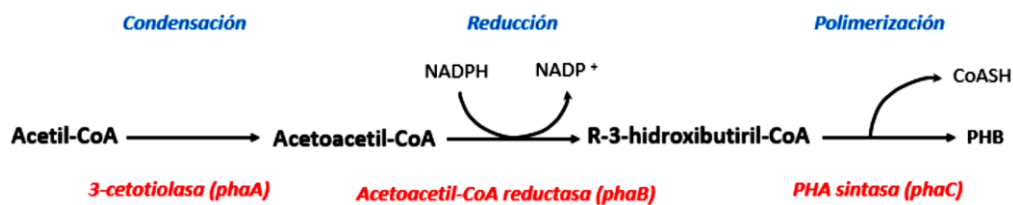
**Figura 1.4** Microfotografía electrónica de *A. vinelandii* con PHB intracelular acumulado (A) y rodeada de alginato (B) (Sabra et al., 2001).

#### 1.4. Producción de PHB

*A. vinelandii* produce polímeros de hidratos de carbono en ciertas condiciones. Estos polímeros, renovables y biodegradables, pueden usarse en dispositivos médicos

biocompatibles y andamiajes para cultivos celulares (Noar & Bruno-Bárcena, 2018; Romo-Uribe et al., 2017; Page, 1995).

Como se muestra en la figura 1.5 en *A. vinelandii*, los genes que codifican las 3 enzimas que participan de la síntesis de PHB están contenidas en un operón biosintético *phbBAC*, el cual codifica las enzimas 3-cetotiolasa (PhaA), aceto-acetilCoA reductasa (PhaB) y PHA sintasa (PhaC), respectivamente (Anderson & Dawes, 1990).



**Figura 1.5** Biosíntesis de PHB. Adaptada (Noar & Bruno-Bárcena, 2018; Peña et al., 2011).

En condiciones de limitación por oxígeno, el exceso de poder reductor (NADH, NADPH) genera una inhibición de las enzimas del ciclo de Krebs, permitiendo la acumulación de moléculas de acetil-CoA, y dando paso a la biosíntesis de PHB, la cual se inicia con la condensación de 2 moléculas de acetil-CoA, para formar acetoacetil-CoA catalizada por la enzima 3-cetotiolasa; posteriormente, dicho compuesto es reducido por una enzima acetoacetil-CoA reductasa, la cual es NADPH dependiente, produciendo R-3-hidroxiacetil-CoA; finalmente, una enzima PHA sintasa cataliza la polimerización de las moléculas de R-3-hidroxiacetil-CoA formadas liberando unidades de CoA.

## 1.5. Biosíntesis de alginato

El proceso de biosíntesis de alginato ha sido ampliamente estudiado en *Azotobacter sp.* y *Pseudomonas sp.* (Franklin et al., 2011; Hay et al., 2013; Urtuvia et al., 2017; Núñez et al., 2022). Se sabe que *Pseudomonas* y *Azotobacter sp.* secretan alginato bacteriano. Los genes involucrados en la biosíntesis son muy similares, pero algunos difieren en su mecanismo de regulación. Los genes se encuentran en un operón que ha sido descrito previamente: *algD*, *alg8*, *alg44*, *algK*, *algJ*, *algG*, *algX*, *algL*, *algI*, *algV*, *algF* y *algA* (Pacheco-Leyva et al., 2016; Hay et al., 2013; Chitnis & Ohman, 1993). En la Figura 1.8 se muestra una representación esquemática de la biosíntesis del alginato sintetizado por *A. vinelandii*, integrando hallazgos recientes sobre esta vía biosintética como se muestra en la Figura 1.5.



**Tabla 1.2** Proteínas involucradas en la biosíntesis de alginato (continuación)

<b>Proteína</b>	<b>Descripción</b>	<b>Localización</b>	<b>Referencia</b>
<b>AlgK</b>	Función exportadora/estructural. Lipoproteína, estabiliza la AlgE.	Membrana externa	(Keiski et al., 2010)
<b>AlgJ</b>	Exportar la cadena de alginato.	Membrana externa	(Whitney et al., 2011)
<b>AlgG</b>	Epimerización de M-G. Manuronano C-5-epimerasa.	Periplasma	(Franklin et al., 1994)
<b>AlgL</b>	Liasa de alginato. Control de peso molecular.	Periplasma	(Jain and Ohman, 2005)
<b>AlgI</b>	O-Acetilación.	Membrana interna	(Franklin & Ohman, 2002)
<b>AlgV</b>	O-Acetilación.	Membrana interna	(Franklin & Ohman, 2002)
<b>AlgF</b>	O-Acetilación.	Periplasma	(Franklin & Ohman, 2002)
<b>AlgX</b>	O-Acetilación.	Periplasma	(Riley et al., 2013)
<b>AlyA1</b>	Liasa de alginato.	Periplasma	(Gimmestad et al., 2009)
<b>AlyA2</b>	Liasa de alginato.	Periplasma	(Gimmestad et al., 2009)
<b>AlgE1-E7</b>	Manuronano C-5-epimerasas extracelulares de <i>Azotobacter</i> .	Extracelular	(Ertesvåg et al., 2009)
<b>AlgW</b>	Homólogo de la serina proteasa DegS de <i>E. coli</i> . Escinde MucA. Regulador positivo.	Membrana interna	(Cezairliyan and Sauer, 2009)
<b>MucP</b>	Homólogo de la proteasa RseP de <i>E. coli</i> . Regulador positivo que escinde MucA.	Membrana interna	(Qiu et al., 2007)

**Tabla 1.2** Proteínas involucradas en la biosíntesis de alginato (continuación)

<b>Proteína</b>	<b>Descripción</b>	<b>Localización</b>	<b>Referencia</b>
<b>AlyA3</b>	Liasa de alginato.	Extracelular	(Gimmestad et al., 2009)
<b>AlyB</b>	Liasa de alginato no caracterizada.	Extracelular	(Gimmestad et al., 2009)
<b>PilZ</b>	Dominio PilZ de la copolimerasa Alg44.	Membrana intern	(Merighi et al., 2007)
<b>AvGReg</b>	El DGC citoplasmático C-di-GMP se produce a partir de dos moléculas de GTP por la acción de (DGC) con un dominio GGDEF.	Cltosol	(Römling et al, 2013)
<b>c-di-GMP</b>	Segundo mensajero Bis (3',5')-cíclico diguanosín monofosfato.	Cltosol	(Ahumada-Manuel et al., 2020)
<b>MucG</b>	Proteína de membrana que afecta negativamente la producción de alginato.	Membrana interna	(Ahumada-Manuel et al., 2017)
<b>MucR</b>	La proteína modula un grupo localizado de c-di-GMP cerca de Alg44.	Membrana interna	(Wang et al., 2015)
<b>MucA</b>	Factor anti $\sigma$ . Regulador negativo.	Membrana interna	(Cezairliyan and Sauer, 2009)
<b>MucB</b>	Estabiliza MucA. Regulador negativo del periplasma.	Periplasma	(Boucher et al., 1997a)
<b>MucC</b>	Papel regulador	Periplasma / membrana interna	(Boucher et al., 1997a)
<b>MucD</b>	Homólogo de la serina proteasa DegP de <i>E. coli</i> . Regulador negativo.	Periplasma	(Wood and Ohman, 2006; Hay et al., 2012)
<b>ClpX/ClpP</b>	Proteasas citoplasmáticas.	Citoplasma	(Qiu et al., 2008)

Los pasos de la biosíntesis del alginato se pueden dividir en tres pasos: síntesis de precursores, polimerización, modificación y secreción de alginato.

### 1.5.1. Síntesis del precursor del alginato

El primer paso para la síntesis del alginato es la obtención del monómero manosa-6-fosfato (M6P). Este paso comienza con la importación de hexosas desde el medio al citosol. La glucosa pasa por reacciones enzimáticas desde la vía de Entner-Doudoroff hasta la formación de gliceraldehído-3-fosfato/di-hidroxiacetona 3-fosfato por la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, estas moléculas son fosforiladas y luego reconvertidas en fructosa 1,6-bifosfato (F6P). Luego por la acción coordinada de tres enzimas, ubicadas en el citosol AlgA, AlgC y AlgD, catalizan cuatro pasos para sintetizar el precursor de la biosíntesis del alginato GDP-ácido manurónico. La F6P se convierte en M6P, catalizada por la fosfomanosa isomerasa (AlgA), luego se convierte en manosa-1-fosfato (M1P) catalizada por la fosfomanosa isomerasa (AlgC), seguida de la conversión a GDP-manosa que es nuevamente catalizada por AlgA (Zielinski et al., 1992). El último paso es la conversión a GDP-ácido manurónico catalizada por GDP-manosa deshidrogenasa (AlgD), que es el paso irreversible en la formación del precursor de alginato y compromete el uso de átomos de carbono hacia la formación de la cadena polimérica (Hay et al., 2013; Gaona et al., 2004; Tavares et al., 1999).

### 1.5.2. Polimerización

El ácido GDP-manurónico se polimeriza a través de dos enzimas que se encuentran dentro de la membrana interna (MI), la glicosiltransferasa/polimerasa (Alg8) y la copolimerasa (Alg44), ambas enzimas son indispensables para la producción de alginato (Urtuvia et al., 2017; Moradali et al., 2015; Oglesby et al., 2008; Galindo et al., 2007; Mejía-Ruíz et al., 1997). El proceso de polimerización y el tránsito de la cadena de alginato recién nacida a través de la membrana ha sido parcialmente descifrado a través de estudios realizados tanto en *P. aeruginosa* como en *A. vinelandii* (Oglesby et al., 2008; Remminghorst & Rehm, 2006). La polimerización del alginato está regulada a nivel postraducciona a través de la interacción entre el dominio PilZ de Alg44 que se une al mensajero secundario bis-(3',5')-guanosina monofosfato cíclico (c-di-GMP) y permite la interacción con otras proteínas que están involucradas en los siguientes pasos de la polimerización y transporte de alginato a través de la membrana (Ahumada-Manuel et al., 2017).

El c-di-GMP es una molécula reguladora global que participa en varios procesos celulares como la motilidad, la producción de exopolisacáridos y la formación de biopelículas (Ahumada-Manuel et al., 2017; Römling et al., 2013). Los niveles intracelulares de c-di-GMP están controlados por las actividades de la diguanilato ciclasa que tiene un dominio conservado que contiene el motivo GGDEF y por las fosfodiesterasas (PDE) que tienen los motivos EAL o HD-GYP. Las proteínas implicadas en las cascadas de transducción de señales tienen dominios de unión de c-di-GMP, que incluyen PilZ (Römling et al., 2013).

En *P. aeruginosa* MucR, una proteína de membrana interna que exhibe actividad de diguanilato ciclasa (DGC) fue identificada como necesaria para la producción de alginato a través de la generación de un pool de c-di-GMP localizado en la vecindad de Alg44 (Hay et al. 2009). Además, la proteína híbrida MucG, que contiene dominios GGDEF y EAL conservados y dominios N-terminales HAMP y PAS tiene actividad PDE, afectando negativamente la cantidad y peso molecular del polisacárido, se ha descrito que la actividad de MucG podría ser modulada en respuesta al estado redox de la célula a través del cofactor FMN (Ahumada-Manuel et al., 2020). Por otro lado, entre las enzimas DGC presentes en *A. vinelandii*, Av GReg, un sensor de globina acoplado (GCS) DGC que se une directamente al oxígeno, fue identificado como el principal contribuyente de la síntesis de c-di-GMP a la producción de alginato. Los niveles elevados de c-di-GMP favorecen la síntesis de alginatos con masas moleculares más altas (Ahumada-Manuel et al., 2020; Martínez-Ortiz et al., 2020). En general, estos hallazgos recientes respaldan firmemente la influencia de ciertas reacciones respiratorias como el consumo de oxígeno y la fijación de nitrógeno durante la producción de alginato por *A. vinelandii*.

### **1.5.3. Modificación, transporte y secreción**

Durante la polimerización, la cadena recién nacida del alginato se sintetiza como un polisacárido de ácido poli-manurónico, el cual es translocado a través del periplasma por la actividad de algunas proteínas periplásmicas AlgX, AlgG y AlgK (Jain et al., 2003; Robles-Price et al., 2004). Durante la translocación, la cadena poli-M del alginato interacciona con el complejo proteico compuesto por AlgI, AlgF, AlgV y AlgX el cual presenta actividad acetiltransferasa, este complejo es capaz de transferir un grupo acetilo del Acetil-CoA el cual actúa como grupo donador a la cadena poli-M, siendo el primer evento de modificación química de la cadena de alginato el cual se realiza sobre el C-2 y/o C-3 de los residuos M. AlgG es identificada como una proteína con actividad manuronano C-5 epimerasa. Aun así, se ha comprobado que su actividad es deficiente en *A. vinelandii*, y su presencia cumple un papel estructural en el complejo de biosíntesis del alginato (Núñez et al., 2022; Ertesvåg,

2015). Debido a esto, el evento principal para la adición de residuos G a la cadena de alginato se realiza después de la secreción del polímero al medio extracelular, donde la actividad de siete epimerasas diferentes (AlgE1-7) en células de *A. vinelandii* puede catalizar la epimerización de residuos M no acetilados a residuos G (Stanisci et al., 2020).

Se ha informado que AlgL es una proteína de degradación del alginato con actividad liasa que está codificada dentro del operón de biosíntesis ubicado en el periplasma. El papel de AlgL es relevante para la viabilidad de los microorganismos mucoides, ejerciendo una función de mantenimiento degradando el alginato atrapado en el periplasma (Jain & Ohman, 2005). AlgL también puede controlar activamente la longitud del polímero y contribuir a la translocación periplásmica (Albrecht & Schiller, 2005; Bakkevig et al., 2005).

AlgK, junto con AlgX son proteínas estructurales relevantes para el proceso de translocación del alginato a través del periplasma, actuando como andamios para el ensamblaje de la maquinaria funcional de biosíntesis del alginato (Keiski et al., 2010). En este contexto, AlgK (al ser una lipoproteína) actúa como un ancla para el complejo proteico tanto en la membrana interna como en la externa. La cadena de alginato, mientras se transporta a través del espacio periplásmico, puede sufrir una modificación de O-acetilación mediante la adición de grupos acetilo O-2 y O-3 de hidroxilo por cuatro enzimas esenciales, AlgI, AlgV, AlgF y AlgX (Fabich et al., 2012; Nivens et al., 2001) esto puede alterar significativamente las propiedades materiales del alginato resultante (Donati et al., 2009). Además, se ha descrito que la O-acetilación del alginato es exclusiva de los alginatos bacterianos, lo que aumenta significativamente la capacidad de retención de agua del alginato, pero también la rigidez y homogeneidad estructural de sus hidrogeles, lo que impulsa el uso del alginato bacteriano como biomaterial (Fabich et al., 2012; Nivens et al., 2001).

Se ha descrito que AlgI y AlgV se encuentran en la membrana interna de células de *A. vinelandii*, mientras que AlgF y AlgX se encuentran en el periplasma (Ertesvåg et al., 2017; Franklin & Ohman, 1996). AlgI transporta grupos acetil-CoA desde el citoplasma hasta el espacio periplásmico donde tiene lugar la acetilación. Los grupos acetilo son transferidos por las acciones de AlgF, AlgX y AlgV para acetilar las subunidades M en la cadena de alginato. AlgG es responsable de llevar a cabo la epimerización de los residuos M no acetilados en *P. aeruginosa*, para luego convertirlos en residuos G dando lugar a la formación de poli-MG de alginato (Maleki et al., 2017; Wolfram et al., 2014). En *A. vinelandii*, AlgG comparte un 60% de homología estructural con AlgG de *P. aeruginosa* y es esencial en el complejo biosintético del alginato, aunque la principal incorporación de residuos G en el polímero se realiza mediante epimerasas solubles a nivel extracelular (Núñez et al., 2022).

*A. vinelandii*, codifica 6 alginato liasas: alginato liasa (AlgL); epimerasa bifuncional extracelular manuronano C-5 y alginato liasa AlgE7 (degrada los enlaces G-MM y G-GM); tres AlyA liasas: AlyA1, AlyA2 y AlyA3 (escinde GM- y MG-), aunque a diferentes velocidades; y una exoliasa, AlyB (no caracterizada) (Ertesvåg, 2015; Gimmetstad et al., 2009; Setubal et al., 2009). Se sabe que AlyA1 y AlyA3 pertenecen a la familia PL7 de liasas de alginato. AlyA2 es necesaria para el crecimiento normal, AlyA1 está relacionada con el crecimiento.

AlgE1-7 son enzimas dependientes de  $Ca^{2+}$  que poseen un dominio regulador (dominio R) sensible al  $Ca^{2+}$  que regula la acción de estas enzimas a través de la afinidad por el sustrato y la modulación catalítica. Estas enzimas cumplen diferentes funciones en *A. vinelandii* ya que se expresan en diferentes condiciones y tienen diferente actividad catalítica en términos de la incorporación de diferentes patrones monoméricos a través de la cadena de alginato. Por ejemplo, AlgE3 y AlgE1 pueden generar patrones largos de MG en la cadena de alginato, y AlgE6 puede introducir bloques G largos, mientras que AlgE4 solo incluye residuos G individuales, lo que promueve la obtención de hidrogeles más flexibles debido a la presencia de bloques MG cortos y bloques GG. En términos de su relevancia fisiológica, AlgE7 actúa durante la germinación celular desde un estado latente de quiste debido a su actividad bifuncional (epimerasa y liasa), AlgE3 y AlgE1 están relacionadas con el crecimiento vegetativo mientras que AlgE2 se encuentra durante la diferenciación de quiste (Moreno et al., 2018; Ertesvåg, 2015; Høidal et al., 2000).

En la última etapa, la proteína porina AlgJ secreta la cadena de alginato al medio extracelular (Hay et al., 2010). Las siete epimerasas extracelulares del manuronato C-5 (AlgE1-7) son las encargadas de modificar las subunidades no acetiladas de la cadena para lograr el producto final (Ahumada-Manuel et al., 2017). AlgE1-7 se pueden agrupar según el tipo de subunidades que introducen en la cadena polimérica del alginato. AlgE1, AlgE3 y AlgE7 introducen bloques MG; AlgE2 y AlgE5 introducen bloques GG; AlgE4 introduce una alta proporción de subunidades G, pero no bloques G consecutivos; y AlgE6 introduce cantidades iguales de bloques M y bloques G (Høidal et al., 2000).

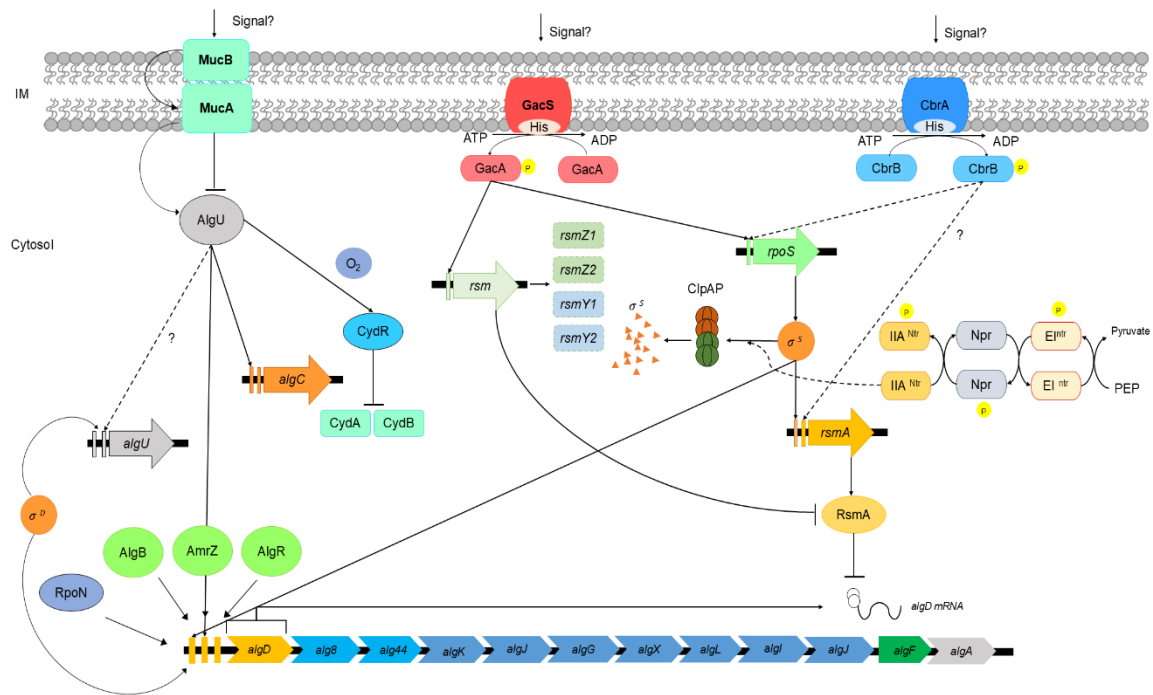
Estas enzimas son proteínas de secuencia homóloga con masas moleculares que van desde 57 a 191 kDa y constan de dos módulos diferentes, A y R. Los módulos R contienen motivos de unión a  $Ca^{2+}$  y son necesarios para la actividad completa, mientras que los módulos A corresponden al módulo catalítico que permite la epimerización, introduciendo diferentes distribuciones de residuos G en el sustrato de alginato, incluyendo bloques G de varias longitudes (Ertesvåg, 2015). El cambio en la composición química del polímero debido a la acción de estas enzimas modificadoras de alginato es esencial durante la diferenciación

celular a quiste, donde se forman capas de alginato con diferentes características estructurales, siendo la exina (capa externa) más rígida y organizada debido a la mayor presencia de residuos G, mientras que la intrina (capa interna) presenta una estructura amorfa debido a la ausencia de residuos G que impide la formación de un hidrogel estable (Gaardl s et al., 2023, 2022, 2021; Martínez-Ortiz et al., 2020). Además, las enzimas modificadoras de alginato pueden utilizarse para la obtención de alginatos a medida para determinadas aplicaciones (Ertesv g, 2015).

## 1.6. Regulación relacionada con la biosíntesis y modificación del alginato

La regulación de la biosíntesis del alginato es un proceso bien conservado tanto en *A. vinelandii* como en *P. aeruginosa*, que también está altamente regulado debido al aporte de energía y al flujo de carbono requeridos para la producción, secreción y modificación de este polímero (Inomura et al., 2017; Pacheco-Leyva et al., 2016; Castillo et al., 2013). En *A. vinelandii*, los genes asociados con la biosíntesis del alginato se agrupan en un operón, lejos del grupo de genes relacionados con la epimerización. Otros genes biosintéticos como *algC* o despolimerasas como *alyA1*, *alyA2* y *alyA3* se pueden encontrar en diferentes ubicaciones. Los eventos regulatorios generales relacionados con la biosíntesis del alginato se pueden separar en tres niveles: transcripcional, postranscripcional y postranscripcional (N n ez et al., 2022). En el caso de la modificación química del alginato, la mayor parte de la regulación ocurre durante la transcripción y el nivel postranscripcional por eventos controlados por el ubicuo mensajero secundario bis-(3'-5')-cíclico dimérico GMP (c-di-GMP), y por la acción de reguladores genéticos globales como AlgR y RpoS.

En la Figura 1.7 se muestra una representación esquemática de la regulación de la biosíntesis del alginato.



**Figura 1.7** Representación esquemática de la regulación del alginato en *A. vinelandii*. Adaptado de (López-Pliego et al., 2020, 2018; Quiroz-Rocha et al., 2017; Romero et al., 2016; Pacheco-Leyva et al., 2016; Damron & Goldberg, 2012; Galindo et al., 2007; Castañeda et al., (2001).

La regulación transcripcional de la biosíntesis de alginato comienza con el gen *algD* que codifica la enzima que regula el flujo de carbono de los azúcares para la obtención del precursor del alginato, el GDP-ácido manurónico. Se han encontrado tres promotores que ejercen efectos positivos sobre la expresión de *algD*, dos de estos promotores son los factores sigma RpoS y AlgU que también activan la expresión de *algC*, y el tercer factor de activación del promotor (*P3algD*) sigue siendo desconocido (Núñez et al., 2022).

En *A. vinelandii*, el factor sigma RpoS lidera la respuesta general contra el estrés oxidativo y la falta de nutrientes y es esencial durante la diferenciación celular hasta el estado latente del quiste. Mientras tanto, el factor sigma AlgU, similar a RpoE, también participa en la respuesta contra el estrés oxidativo y es fundamental para la producción de alginato durante el crecimiento vegetativo y el enquistamiento (Chowdhury-Paul et al., 2023; Martínez-Salazar et al., 1996). MucA es un factor antisigma que secuestra a AlgU impidiendo su acción como promotor de la expresión de *algD*. Curiosamente, AlgU y MucA, junto con otros factores

antisigma como MucB, MucC y MucD, están codificados en el mismo operón, lo que sugiere un posible papel en la regulación de la biosíntesis de alginato. Sin embargo, hasta la fecha no se ha dilucidado el papel regulador de MucC y MucD (Núñez et al., 2022). La acción de RpoS está controlada por los reguladores de respuesta RssB/RssC, que promueven la degradación de RpoS a través de ClpXP durante el crecimiento vegetativo, actuando como represor del fenotipo relacionado con RpoS hasta la fase estacionaria (Rodríguez-Martínez et al., 2023).

Después de la transcripción, el ARNm de *algD* es regulado a nivel postranscripcional por la proteína RsmA (CsrA). Los sistemas Rsm son proteínas de unión al ARN que actúan como reguladores postranscripcionales pertenecientes a la familia RsmA/CsrA, en *A. vinelandii* RsmA se une al sitio de unión al ribosoma del ARNm de *algD*, impidiendo su traducción y afectando negativamente la producción de alginato. La expresión de *algD* puede ser restaurada por la expresión de ARN reguladores pequeños (RsmZ1-8 y RsmY), estos sRNAs saturan el sitio de unión de RsmA permitiendo la traducción del ARNm de *algD*. El sistema de dos componentes (TCSs) GacA/GacS supervisa la expresión de RsmZ1-7 y RsmY, se ha demostrado que la eliminación de *gacA* o *gacS* impide la expresión de *algD* a través de la acción de RsmA, y por lo tanto se anula la biosíntesis de alginato (López-Pliego et al., 2020; Rosales-Cruz et al., 2024). Otro TCS involucrado en la biosíntesis de alginato es la histidina quinasa CbrA y su regulador de respuesta CbrB, estos TCS junto con el sistema de represión de catabolitos de carbono (Crc) controlan el flujo de carbono en *A. vinelandii* y *P. aeruginosa*. Los mutantes CbrA/CbrB en *A. vinelandii* silvestre han mostrado un fenotipo de sobreproducción de alginato. Otros estudios han demostrado que este TCS es necesario para la alta expresión de *rsmA* y RpoS en *A. vinelandii* (Quiroz-Rocha et al., 2017).

El C-di-GMP es un mensajero secundario universal en bacterias que controla muchos procesos fisiológicos como la motilidad, la patogénesis, la diferenciación celular, la formación de biopelículas y la producción de exopolisacáridos. En *A. vinelandii* (como en *P. aeruginosa*), la polimerización del alginato a través del complejo de polimerasa Alg8/Alg44 depende de la presencia de c-di-GMP a través de la unión al dominio PilZ de Alg44; en ausencia de este mensajero secundario, la producción de alginato se elimina; en el otro caso, su acumulación sobreestimula la producción de alginato (Merighi et al., 2007). El grupo de c-di-GMP se regula a través de la síntesis/degradación por enzimas específicas. Las diguanilato ciclasas (DGC) catalizan la producción de c-di-GMP mediante la unión de dos moléculas de GTP en su sitio activo caracterizado por su dominio GGDEF; por lo general, las DGC contienen un sitio de inhibición alostérica que reconoce c-di-GMP, por lo que estas enzimas se inhiben por su producto. La degradación de c-di-GMP ocurre por la acción de las fosfodiesterasas (PDE) en

los dominios específicos EAL o HD-GYP que catalizan la hidrólisis de este mensajero secundario (Liang et al., 2022; Moradali & Rehm, 2020; Whitney et al., 2015). En el contexto de la regulación postraduccional de la biosíntesis de alginato en *A. vinelandii*, AvGReg (DGC), MucR (DGC) y MucG (DGC-PDE) son las principales enzimas que controlan el grupo de c-di-GMP y, por lo tanto, promueven o frenan la producción de alginato.

AvGReg es un sensor acoplado a globina con actividad DGC que se une directamente al oxígeno y se considera el principal contribuyente a la síntesis de c-di-GMP para la producción de alginato. MucG puede sintetizar o degradar c-di-GMP debido a la presencia de los dominios GGDEF y EAL. Aun así, su actividad PDE es la única relacionada con la inhibición de la producción de alginato ya que los mutantes  $\Delta$ MucG pueden sobreproducir este polímero. También es relevante señalar que MucG tiene un dominio PAS que se une al cofactor flavina adenina dinucleótido (FAD) actuando como un sensor de estado redox. Ambas evidencias sugieren una relación entre el metabolismo respiratorio, el estado redox de la célula y la producción de alginato en *A. vinelandii*, ya que se ha demostrado que las bacterias mutantes afectadas en componentes de la cadena respiratoria muestran una mayor producción de alginato (Núñez et al., 2022; Ahumada-Manuel et al., 2020; Germani et al., 2020; Ahumada-Manuel et al., 2017). Curiosamente, la PDE MucR no es esencial para la polimerización del alginato, pero sí lo es durante el proceso de enquistamiento, ya que los mutantes  $\Delta$ MucR son incapaces de resistir la desecación debido a la falta de una cápsula de alginato bien ensamblada (Martínez-Ortiz et al., 2020).

Los quistes de *A. vinelandii* están compuestos por dos capas de alginato llamadas intina y exina en las cuales el contenido de ácido gulurónico de ambas capas difiere, la exina presenta una relación G/M más alta que la intina, en consecuencia, la exina presenta una forma rígida y estructurada en contraste con la intina que presenta una característica estructural más amorfa (Martínez-Ortiz et al., 2020) destacaron que MucR regula positivamente la transcripción de los genes *algE1-E6* a través de la señalización c-di-GMP, probablemente actuando a través del regulador transcripcional FleQ que presenta sitios de unión en la región reguladora de los genes *algE1-algE7*. Además, la expresión de MucR está regulada a través de AlgR, por lo que también es relevante en la regulación de la modificación química del alginato, ya que las bacterias  $\Delta$ AlgR perjudican la organización adecuada de la capa del quiste. Mientras tanto, la señalización de c-di-GMP también contribuye a determinar el peso molecular de la cadena de alginato, ya que un aumento en el acervo intracelular de c-di-GMP promueve la producción de alginatos con mayor peso molecular medio (MMW), y AvGReg y MucG regulan este fenotipo.

En cultivos de *A. vinelandii*, una mayor velocidad de transferencia de oxígeno (VTO) impide la obtención de alginatos de alto peso molecular, ya que una disminución de la VTO promueve la polimerización del alginato a través de una mayor acumulación de c-di-GMP (Ahumada-Manuel et al., 2020). Las enzimas detectoras de oxígeno regulan este c-di-GMP: AvGReg (promueve la acumulación de c-di-GMP a través de la actividad de DGC, en presencia de unión intracelular de O<sub>2</sub>) y MucG (reducción del pool de c-di-GMP a través de la actividad de PDE que se regula a través de la unión de FAD como sensor de estado redox) (Noar & Bruno-Bárcena, 2018; Ahumada-Manuel et al., 2017; Peña C et al., 2011).

Se ha descrito que la epimerización de la cadena de alginato ocurre a nivel extracelular debido a la acción de las epimerasas de alginato AlgE1-7 que incorporan diferentes patrones de bloques MG o GG de longitud variable dependiendo de la actividad individual de cada epimerasa. Por ejemplo, la modificación de AlgE4 incorpora bloques MG largos a lo largo de la cadena de alginato, y AlgE7 promueve bloques GG largos en la cadena de alginato en su lugar (Petersen et al., 2023). La excreción de estas epimerasas requiere la expresión del sistema de transporte tipo 1 *eexDEF* que facilita el transporte de estas enzimas a través de la membrana (Gimmestad et al., 2006). El sistema de transporte EexDEF está codificado en un operón y dos promotores controlan su expresión, P2eexD es dependiente de RpoS y está relacionado con la diferenciación de quistes ya que RpoS también muestra un control positivo en la expresión de los genes *AlgE1-7*, ya que AeRpoS (microorganismo modificado  $\Delta RpoS$ ) muestra la capacidad de producir una capa de alginato que no puede resistir la desecación, probablemente a la falta de una estructura organizada capaz de proteger la célula latente. P1eexD es otra región promotora que es un activador desconocido. Se ha demostrado que el contenido de gulurónico en alginato puede alterarse a través de la concentración de oxígeno en el cultivo (Sabra et al., 2000) y probablemente P1eexD está involucrado como un punto de control clave ya que es necesario para la excreción de epimerasa en otras condiciones no relacionadas con el control de RpoS (Moreno et al., 2018; Cocotl-Yañez et al., 2014).

### **1.7. Respiración en *A. vinelandii***

El oxígeno es un nutriente esencial para el crecimiento, mantenimiento y producción de metabolitos, como el alginato (Flores et al., 2015). La respiración celular es un proceso que transfiere equivalentes reductores desde un donador a un aceptor de electrones mediante una enzima deshidrogenasa, finalizando con una enzima reductasa terminal (Kaila &

Wikström, 2021) (Price et al., 2021). Este flujo crea un gradiente de protones que sintetiza ATP, esencial para el metabolismo bacteriano en diversos ambientes (Richardson, 2000).

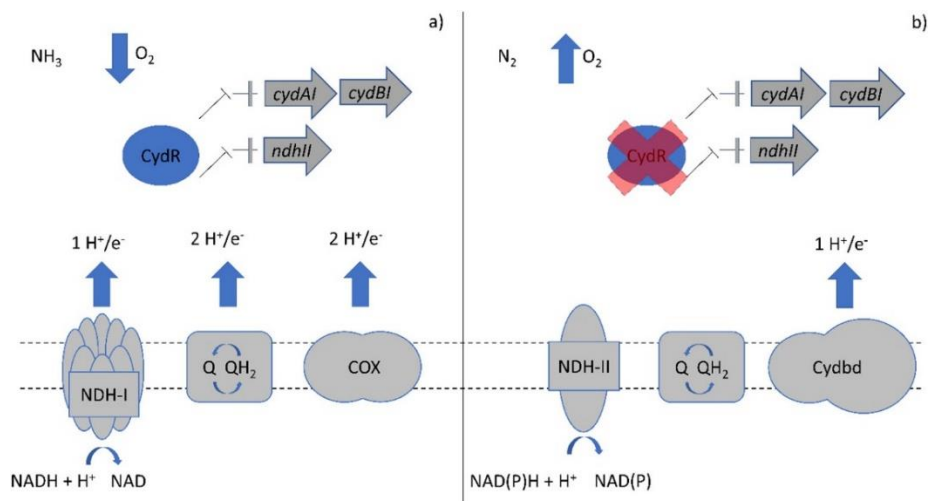
Como se ha mencionado anteriormente, *A. vinelandii* es una bacteria aerobia que tiene la capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico y utiliza un sistema respiratorio versátil. En condiciones aeróbicas, su cadena de transporte de electrones incluye complejos como la NADH deshidrogenasa y la citocromo c oxidasa. En condiciones de bajo nivel de oxígeno, *A. vinelandii* puede ajustar su respiración para mantener la eficiencia energética, utilizando otros aceptores de electrones. Este proceso es crucial para su capacidad de fijación de nitrógeno, lo que la convierte en un organismo importante en la agricultura y la biotecnología (García et al., 2020; Natzke et al., 2018; Setubal et al., 2009; Oelze, 2000)

Como se muestra en la Figura 1.8, se han identificado cinco oxidasas terminales en su genoma: dos tipos de citocromos bd y uno de cada uno de los citocromos c, o y cbb3. Estas oxidasas terminales pueden interactuar con tres tipos diferentes de NADH deshidrogenasas, que transfieren equivalentes reductores a la ubiquinona-8: NADH deshidrogenasa I (NDH I), NADH deshidrogenasa II (NDH II) y NADH deshidrogenasa translocadora de sodio (Na<sup>+</sup>-NQR) (Hamilton et al., 2011; Núñez et al., 2009; Setubal et al., 2009).

Dentro de la cadena respiratoria, el género *Azotobacter* ha sido objeto de amplios estudios debido a su capacidad para fijar nitrógeno mediante la enzima nitrogenasa, incluso en presencia de altas concentraciones de oxígeno. Uno de los mecanismos clave para proteger el complejo nitrogenasa en esta bacteria es la “protección respiratoria”, que consiste en un aumento de la velocidad de respiración en condiciones de alta concentración de oxígeno y en condiciones diazotróficas. Este proceso se debe a la actividad de la cadena respiratoria desacoplada, formada por el citocromo bd y la NDH II deshidrogenasa (Inomura et al., 2017; Poole & Hill, 1997).

Los citocromos bd se sintetizan en condiciones diazotróficas y a altas concentraciones de oxígeno. En *A. vinelandii*, existen cuatro NADH-ubiquinona oxidorreductasas (Bertsova et al., 1998). La NDH-I se activa a baja concentración de oxígeno, mientras que la NDH-II se activa a alta concentración. La expresión de NDH-II y citocromo bd está regulada negativamente por CydR, una proteína sensible al oxígeno controlada por AlgU, un factor sigma que regula la síntesis de alginato (León & Espín, 2008; Martínez-Salazar et al., 1996) (Figura 1.6).

Por otra parte, el genoma de *A. vinelandii* muestra tres oxidasas terminales: citocromo c, citocromo o y citocromo cbb3. Estas oxidasas pueden reducir el ubiquinol-oxígeno directamente del complejo ubiquinona o a través de una vía de dos pasos que incluye la citocromo c reductasa. Es notable que el citocromo bd se exprese a bajas concentraciones de oxígeno, lo que sugiere que ayuda a optimizar la conservación de energía (Setubal et al., 2009).



**Figura 1.8** Esquema de las cadenas respiratorias acoplada y desacoplada, de *A. vinelandii*. (Castillo et al., 2020).

### 1.7.1. Parámetros de cultivo que afectan la respiración en *A. vinelandii*

Se ha descrito que la velocidad de respiración de *A. vinelandii* puede estar determinada por el tipo de microorganismo, la velocidad específica de crecimiento, la disponibilidad de oxígeno y la fuente de nitrógeno. Sobre todo, se cree que, la fuente de nitrógeno es uno de los parámetros que impacta la velocidad de respiración de *A. vinelandii* debido al costo energético que implica el mantenimiento celular de cultivos que son crecidos bajo diazotrofia y a altas concentraciones de oxígeno debido a la protección respiratoria (Barney, 2020; Inomura et al., 2017). En la Tabla 1.3 se presentan reportes de diversos autores en cultivos por lotes y continuos utilizando *A. vinelandii*. Diversos autores han reportado que, en cultivo continuo, *A. vinelandii* presenta una alta velocidad de respiración, cuando son cultivadas bajo diazotrofia y altas concentraciones de oxígeno (Tensión de oxígeno disuelto (TOD)  $\geq 10\%$ ). De acuerdo con este planteamiento, (Sabra et al., 2000) observó que hubo un aumento lineal en los valores de  $q\text{O}_2$  obtenidos por *A. vinelandii* en cultivos continuos cuando la TOD aumentó de 0,5 a 5%. Por otro lado, no se encontró una diferencia mayor en los valores de la  $q\text{O}_2$  cuando la TOD aumento de 5 a 10%. Por otro lado, (García et al., 2018) demostraron en cultivos continuos de *A. vinelandii* utilizando una fuente

de nitrógeno que se puede obtener un aumento en los niveles relativos de transcripción de *cydA* y *ndhII* (codifican citocromo b y NADH deshidrogenasa II) aumentando la  $qO_2$  en el cultivo.

**Tabla 1.3** . Comparación de  $qO_2$  en *A. vinelandii* cultivadas en diferentes condiciones de crecimiento

Microorganismo	Fuente de nitrógeno	Condiciones de crecimiento	$qO_2$ ( $mmol\ g^{-1}\ h^{-1}$ )	Referencia
DSM93-551b	Diazotrofia	D=0,08 $h^{-1}$ TOD=0,5%	7,5	(Sabra et al., 2000a)
		D=0,26 $h^{-1}$ TOD=0,5%	15	
		D=0,08 $h^{-1}$ TOD=5-10%	30	
		D=0,26 $h^{-1}$ TOD=5-10%	70	
ATCC9046	NH <sub>4</sub>	300 rpm (1vvm) D=0,08 $h^{-1}$	3.7	(García et al., 2018)
		700 rpm (1vvm) D=0,08 $h^{-1}$	20	
ATCC9046	Diazotrofia	200 rpm 10 mL de llenado / 250 mL total	55	(Castillo et al., 2018)
ATCC9046	NH <sub>4</sub>	5% TOD (300 rpm)	24	(Lozano et al., 2011)
		0,5% TOD (300 rpm)	8.5	
		5% TOD (700 rpm)	29	
		0,5% TOD (700 rpm)	28	
ATCC9046	Extracto de levadura	200 rpm 100 mL de llenado / 500 mL total	12	(Peña et al., 2011)
		100 rpm 100 mL de llenado / 500 mL total	5,2	
		100 rpm 100 mL de llenado / 500 mL total	5,2	
ATCC9046	Diazotrofia	500 rpm (1vvm) control VTO	8,3	(Ponce et al., 2021a)
		500 rpm (1vvm) control VTO	23,7	
ATCC9046	Diazotrofia	300 rpm (1vvm)	30,8	(Díaz-Barrera et al., 2021)
		500 rpm (1vvm)	52,4	
		700 rpm (1vvm)	63,7	

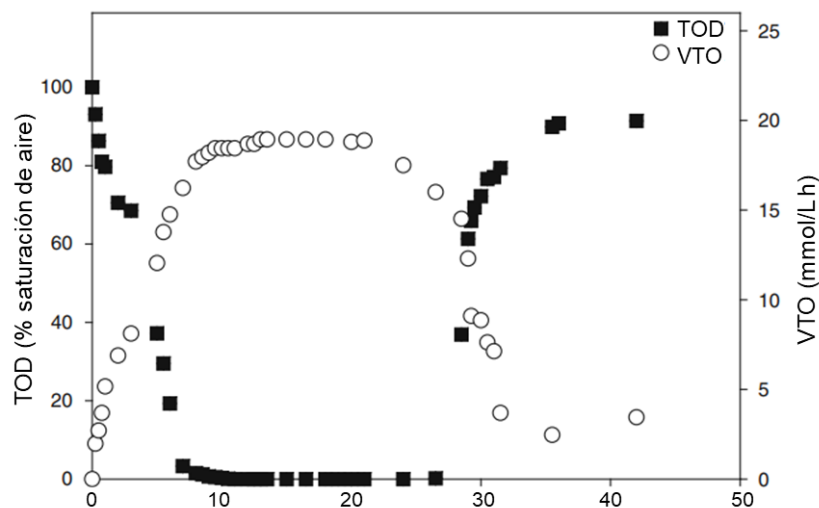
### 1.7.2. Respiración de *A. vinelandii* y su relación la producción de alginato.

Varios estudios han reportado que la producción de alginato realizada por *A. vinelandii* está influenciada por la TOD, la velocidad de agitación, la aireación y la VTO (Castillo et al., 2020; Urtuvia et al., 2017; Flores et al., 2015; Díaz-Barrera, et al., 2014; Díaz-Barrera et al., 2007; Galindo et al., 2007).

Se sabe que, durante la biosíntesis de alginato bacteriano, por unidad monomérica se consume una molécula de ATP y una molécula de GTP, y se liberan dos moléculas de NADH. Este proceso tiene una alta demanda de energía, también contribuye a reducir la generación de energía, y se ha sugerido que la biosíntesis del alginato impone una velocidad de consumo de oxígeno en la célula (VCO), lo cual es correlacionado con la demanda de energía para la síntesis de este polímero (Mærk et al., 2020). *A. vinelandii* se destaca por su alta velocidad de respiración (Díaz-Barrera et al., 2007) y durante el crecimiento de *A. vinelandii* el oxígeno disuelto es cercano a cero, lo cual determina condiciones de limitación de oxígeno en los cultivos (Díaz-Barrera, Gutierrez, et al., 2014).

Durante un cultivo típico de *A. vinelandii*, la TOD en un cultivo depende de la VTO desde la fase gaseosa a la fase líquida y de la VCO (Flores et al., 2015). En la Figura 1.9 se puede observar el clásico perfil de VTO y TOD de *A. vinelandii*. Al iniciar el cultivo la VTO aumenta gradualmente hasta llegar a un valor máximo ( $VTO_{m\acute{a}x}$ ), que es que es la máxima capacidad de transferencia de masa de gas-líquido del sistema del reactor, y está indicado por el mayor valor sostenido de VTO durante la fermentación (Maier & Büchs, 2001) la cual se mantiene constante en un *plateau*, lo que es propio de fermentaciones que transcurren bajo limitación de oxígeno (Anderlei et al., 2004). Además, el aumento en la VTO se correlaciona con un descenso en la TOD, la cual llega a valores muy cercanos a 0, característico de *A. vinelandii* debido a su alta velocidad de respiración (Díaz-Barrera, Gutierrez, et al., 2014). La velocidad de agitación en un cultivo está directamente relacionada con la  $VTO_{m\acute{a}x}$ . Un aumento en la velocidad de agitación de un cultivo y por consiguiente un aumento en la VTO provoca un incremento en la concentración de alginato (Ponce et al., 2021a; Díaz-Barrera et al., 2021; Díaz-Barrera, Gutierrez, et al., 2014; Díaz-Barrera et al., 2007). Por otro lado, a menores VTO, el peso molecular del alginato y su grado de acetilación se incrementan (Castillo et al., 2013; Flores et al., 2015; Peña C et al., 2011). Por otra parte, se tiene evidencia que a mayores velocidades de agitación aumenta el contenido de G del alginato (Díaz-Barrera et al., 2021; Sabra et al., 2000a).

La respiración puede ser evaluada midiendo la VCO en el cultivo. Bajo condiciones de limitación de oxígeno, el oxígeno disuelto es cercano a cero ( $dO_2/dt \approx 0$ ), y en base a la ecuación de balance de oxígeno ( $dO_2/dt = VTO - VCO$ ), es posible que la VTO sea igual a la VCO. En un cultivo limitado por oxígeno, la VTO es constante en la fase de crecimiento y es igual a la VCO (Castillo et al., 2018; Garcia-Ochoa et al., 2010a). Se conoce que la VTO afecta el peso molecular del alginato (Díaz-Barrera, et al., 2014) y la VCO podría estar relacionada con la producción de alginato y la expresión de algunos genes implicados en su biosíntesis (Díaz-Barrera et al., 2009).



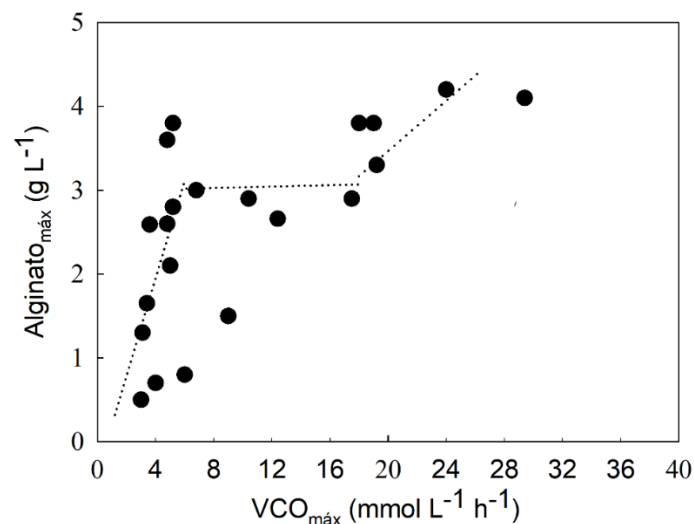
**Figura 1.9** Perfil característico de TOD y VTO en cultivos de *A. vinelandii*. Modificado de (Díaz-Barrera, Gutierrez, et al., 2014).

La respiración celular puede ser evaluada  $qO_2$  la cual establece una relación entre la VCO y la concentración de biomasa. (Díaz-Barrera et al., 2011). En un estudio en cultivo continuo la producción de alginato a tres diferentes  $qO_2$  y observó que un aumento de la  $qO_2$  incrementa la producción de alginato, disminuyendo el peso molecular. Además, en cultivos a una  $qO_{2máx}$  se observó una mayor expresión de la alginato liasa *algL*, lo que explica la disminución en el peso molecular del alginato sintetizado. En la Figura 1.9 se muestran datos de  $VCO_{máx}$  y producción de alginato en cultivos por lotes. Se observa que a valores más altos de  $VCO_{máx}$  se obtiene una mayor producción de alginato (Medina et al., 2023; Ponce et al., 2021a; Díaz-Barrera et al., 2021; García et al., 2020; Castillo et al., 2018; Jiménez et al., 2016; Díaz-Barrera, Gutierrez, et al., 2014; Lozano et al., 2011; Díaz-Barrera et al., 2007).

Existe una relación entre la producción de alginato máxima y la  $VCO_{máx}$  (Figura 1.9). Se puede observar que la producción de alginato aumenta a medida que aumenta la VCO, y las

concentraciones más altas de alginato se producen cuando la  $VCO_{\text{máx}}$  supera los 24-29  $\text{mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$ . (Castillo et al., 2018) demostraron que el factor sigma E (AlgU) en *A. vinelandii* controla la expresión del gen *cydR*, un represor de los genes de la cadena respiratoria, por ende, el alginato actúa como una barrera para la difusión de oxígeno, lo que conduce a concentraciones más altas de alginato cuando aumenta la VTO. A nivel molecular, sería interesante evaluar a diferentes  $qO_2$  cómo cambia la expresión de los genes de la cadena respiratoria desacoplada.

Por otra parte, (Medina et al., 2023) exploraron más a fondo la producción de alginato en cultivo por lotes utilizando Bacteria *A. vinelandii* AT9 a diferentes condiciones de VTO, que van desde 3,6 a 12,4  $\text{mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$ . Sus resultados mostraron que el aumento de  $VTO_{\text{máx}}$  aumentó el crecimiento celular como la producción de alginato, con una concentración máxima de alginato de 3,0  $\text{g L}^{-1}$  alcanzada a 6,8  $\text{mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$ . Por el contrario, a un VTO más baja de 3,6  $\text{mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$ , la producción de alginato se redujo a 2,59  $\text{g L}^{-1}$ . Estos hallazgos sugieren que controlar  $VTO_{\text{máx}}$  puede mejorar significativamente tanto el rendimiento como la calidad del alginato.



**Figura 1.9.** Relación entre  $VCO_{\text{máx}}$  y producción de alginato en cultivos por lotes de *A. vinelandii*.

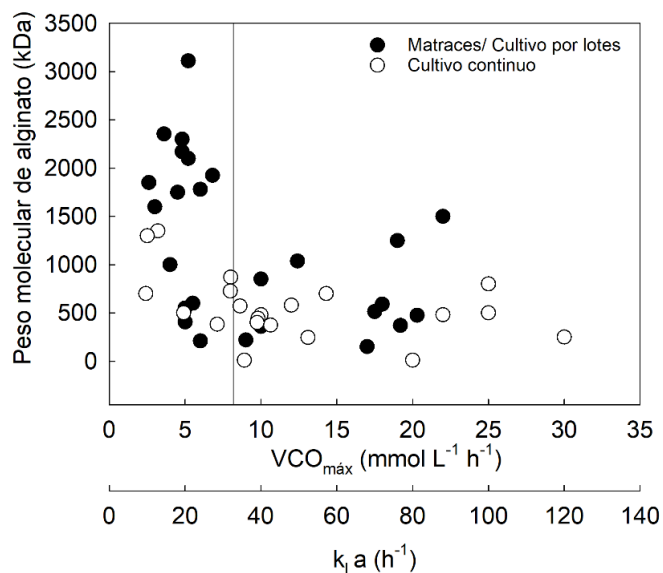
En otro estudio, (Jiménez et al., 2016) investigaron la actividad respiratoria y la utilización de carbono en la bacteria mutante AT6 de *A. vinelandii*, que es incapaz de producir poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB), y la compararon con *A. vinelandii* ATCC 9046. La bacteria mutante AT6 exhibió una mayor producción de alginato, VTO  $qO_2$ , con aumentos de 2,5 veces, 60% y 62%, respectivamente, en comparación con *A. vinelandii control*. En condiciones de limitación de oxígeno (1% TOD), estos resultados indican que el flujo de acetil-

CoA, un precursor tanto para la biosíntesis de PHB como para la acetilación de alginato, se redirigió hacia la cadena respiratoria a través del ciclo del ácido tricarbóxico en la bacteria AT6.

Aunque existen evidencias respecto a la producción de alginato en cultivos a diferentes VCOs (Bertsova et al., 1998; Jiménez et al., 2016; Lozano et al., 2011) aún no se conoce con detalle que efecto a nivel intracelular tiene la respiración celular sobre la calidad del alginato. Asimismo, las evidencias existentes (Díaz-Barrera et al., 2021, 2011) han evaluado cambios en la VTO (y por tanto de la VCO) bajo condiciones cambiantes de agitación, lo cual tiene efectos sobre la hidrodinámica de los cultivos. Es por esta razón que resulta importante poder dilucidar si un cambio en la velocidad de agitación del cultivo tiene efectos sobre la respiración celular lo cual sería determinante para definir el peso molecular de alginato producido por *A. vinelandii*.

Como bien se ha mencionado, en diferentes artículos de *A. vinelandii* se ha reportado que tiene una alta actividad respiratoria. Por ende, los cultivos que operan sin control de la TOD operan a un valor cercano a cero y bajo estas condiciones el parámetro VTO o VCO puede ser utilizado para evaluar el crecimiento celular y la producción de alginato en células de *A. vinelandii*. Durante los últimos años, varios estudios han reportado mediciones de VTO y/o VCO durante la fermentación de cultivos de *A. vinelandii* llevada a cabo en matraces o en un biorreactor, donde se concluye que el peso molecular del alginato puede ser modulado por el VCO del cultivo; cuando el valor de la VCO es bajo se puede obtener un alto peso molecular de alginato; mientras que, en cultivos con altos valores de VCO, generalmente el peso molecular del alginato parece ser independiente de la  $VCO_{m\acute{a}x}$ .

Para relacionar como la VCO afecta la producción de alginato la Figura 1.10 muestra una relación entre la  $VCO_{m\acute{a}x}$  de un cultivo y su efecto en el PMP del alginato. Esta figura muestra una recopilación de diferentes estudios (n=16), estableciendo una relación entre  $VCO_{m\acute{a}x}$ , utilizando diferentes estrategias de cultivo y cómo este parámetro de respiración impacta el peso molecular del alginato en diferentes microorganismos de *A. vinelandii* (Medina et al., 2023; Contreras-Abara et al., 2023; Díaz-Barrera et al., 2021; Ponce et al., 2021; García et al., 2020; Díaz-Barrera et al., 2017; Gómez-Pazarín et al., 2016; Díaz-Barrera et al., 2014; Díaz-Barrera et al., 2014; Díaz-Barrera et al., 2012; Lozano et al., 2011; Peña et al., 2011; Díaz-Barrera et al., 2011, 2010, 2009, 2007)



**Figura 1.10** Relación entre  $VCO_{m\acute{a}x}$  y el peso molecular de alginato en cultivos de *A. vinelandii* (●) cultivo en matraces y cultivos por lotes, (○) cultivos continuos.

En matraces se estableció que a menor  $VCO_{m\acute{a}x}$  (entre 2,6 y 5  $\text{mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) se pueden observar pesos moleculares entre 1850 y 3112 kDa. García et al., (2020) describe que, al utilizar microorganismos mutantes, el mayor peso molecular (3112 kDa) se alcanzó en cultivos realizados con *A. vinelandii* AT9. Estos valores fueron superiores a los obtenidos para alginatos producidos por la *A. vinelandii* ATCC 9046 cultivada en condiciones similares. Estos resultados demuestran que al utilizar microorganismo modificados en condiciones microaerófilas es posible obtener un polímero que tiene un alto peso molecular promedio. En consecuencia, podría ser una estrategia efectiva para producir alginatos destinados a aplicaciones industriales.

En cultivos por lotes, se observa que existe una relación directa entre la  $VCO_{m\acute{a}x}$  y el PM del alginato, donde a una  $VCO_{m\acute{a}x}$  baja (3,6  $\text{mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) el valor de peso molecular es de 2355 kDa utilizando *A. vinelandii* AT9. En general, estos resultados indican que es posible manipular el peso molecular de los alginatos bacterianos producidos por *A. vinelandii* AT9 (Medina et al., 2022). Sin embargo, al incrementar la  $VCO_{m\acute{a}x}$  (entre 9 y 20,3  $\text{mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) los valores de peso molecular varían entre 370 y 513 kDa.

Por otro lado en cultivo continuo, (Díaz-Barrera et al., 2011) utilizando *A. vinelandii* ATCC 9046 en cultivo continuo, evaluó la producción de alginato a diferentes VTO (o VCO) en condiciones limitadas de oxígeno. Un aumento en VTO (3,2 a 8,0  $\text{mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) resultó en un aumento en la concentración de alginato, sin embargo, el peso molecular disminuyó (1350 a 869 kDa). Este estudio reveló que la manipulación de este parámetro podría usarse como una estrategia de control para la producción de alginato. Por otro lado, se observa que al

aumentar VTO (8 a 40 mmol L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) el peso molecular se mantiene entre 400 y 800 kDa esto indicaría que el PM del alginato no depende de VTO (Contreras-Abara et al., 2023; Díaz-Barrera et al., 2017; Díaz-Barrera, Martínez, et al., 2014; Sabra et al., 2000a)

Independientemente de la modalidad de cultivo, los datos recopilados hasta la fecha han demostrado que el peso molecular del alginato puede ser modulado por la VCO del cultivo. Por ejemplo, en cultivos cultivados a baja VCO (por debajo de 9 mmol L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>), se puede obtener el mayor peso molecular del alginato; mientras que, en cultivos cultivados a valores de VTO superiores a 9 mmol L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, en general, el peso molecular del alginato parece ser independiente de la VCO<sub>máx</sub>.

La respiración celular puede ser evaluada también como la velocidad específica de consumo de oxígeno (qO<sub>2</sub>), la cual establece una relación entre la VCO y la concentración de biomasa. Para relacionar como la qO<sub>2</sub> afecta la producción de alginato, en la Tabla 1.4 se muestra una comparación entre qO<sub>2</sub>, la fuente de nitrógeno, velocidad de agitación y como afecta el peso molecular de alginato en distintos microorganismos de *A. vinelandii*.

**Tabla 1.4** Valores de qO<sub>2</sub> y PMP de alginato en cultivos de *A. vinelandii*

Tipo de cultivo	Microorganismo	Condición de cultivo	Velocidad de agitación (rpm)	qO <sub>2</sub> (mmol g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	PMP (kDa)	Referencia
Matraz	ATCC9046	No diazotrofia	200	12	1750	Peña et al., (2011)
		No diazotrofia	100	5,2	1850	
Biorreactor	ATCC9046	Diazotrofia	500	23,7	475	Ponce et al., (2021)
		Diazotrofia	500	8,3	513	
	ATCC9046	Diazotrofia	300	26,4	N.D.	Jiménez et al., (2016)
	AT6	Diazotrofia	300	42,0	N.D.	
	ATCC9046	Diazotrofia	300	30,8	406	Díaz-Barrera et al., (2021)
		Diazotrofia	500	52,4	520	
Diazotrofia		700	63,9	370		

N.D: No determinado.

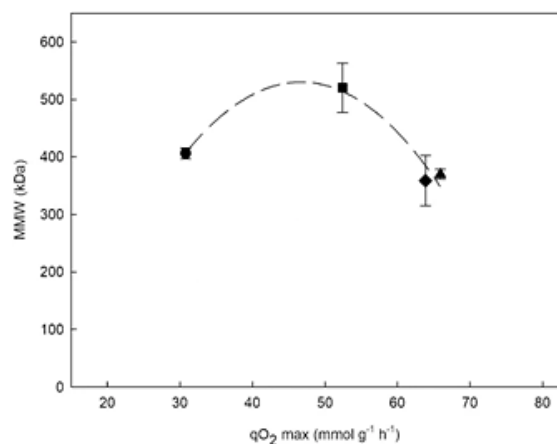
Como se observa en la Tabla 1.4, en *A. vinelandii* los valores de qO<sub>2</sub> varían entre 5 y 64 mmol g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. En cultivos en matraces agitados bajo condiciones no diazotróficas se ha observado

que, a una mayor agitación se obtiene un valor de  $qO_2$  dos veces superior que cuando la agitación se disminuye a la mitad, por lo que existe un efecto de la velocidad de agitación sobre el valor de  $qO_2$ . Sin embargo, no se observa una diferencia notoria en el tamaño del polímero a diferentes valores de  $qO_2$  (Peña et al., 2011).

Se ha reportado que en cultivos realizados a una VTO controlada, la  $qO_{2max}$  es casi tres veces más alta que cuando el cultivo es sin control de VTO. En cambio, el peso molecular disminuyó a una VTO controlada, por lo que existe una relación inversa, a una mayor  $qO_2$  el peso molecular de alginato disminuye, una posible explicación de esto es que el flujo de carbono a través del ciclo TCA es mejorado favoreciendo la síntesis de alginato. Además, la expresión de la alginato liasa *alyA1* se ve más afectada a una  $qO_{2max}$  alta disminuyendo el peso molecular de alginato (Ponce et al., 2021a; Díaz-Barrera et al., 2007).

En cultivos de *A. vinelandii* ATCC 9046 y AT6 (microorganismo incapaz de producir PHB) se observó que en cultivos de la *A. vinelandii* AT6 se alcanza una mayor  $qO_{2max}$  ( $\geq 62\%$ ) en comparación a los cultivos de ATCC 9046, lo cual es explicado porque *A. vinelandii* AT6 al ser incapaz de producir PHB, favorece el flujo de carbono hacia el ciclo del TCA produciendo cambios importantes como el incremento de la producción de alginato (Jiménez et al., 2016).

Recientemente, Díaz-Barrera et al., (2021) describieron una relación entre la  $qO_2$  y el peso molecular del alginato. En la Figura 1.11 se observa que el PMP del alginato varía conforme a cambios en la  $qO_{2max}$ , lo cual podría interpretarse como un efecto de la respiración celular sobre la calidad del alginato.



**Figura 1.11** Relación entre  $qO_2$  y el peso molecular máximo de alginato en cultivos de *A. vinelandii*. 3 L: PMP: 300 rpm (◆); 500 rpm (●), 700 rpm (■); 30 L: PMP (▲)(Díaz-Barrera et al., 2021).

## 1.8. Efectos de las condiciones de hidrodinámica

Cómo se ha mencionado anteriormente, el oxígeno es un sustrato clave para el crecimiento celular, el mantenimiento, respiración y la biosíntesis del alginato. El oxígeno tiene una solubilidad muy baja en los caldos de fermentación (7 - 9 mg L<sup>-1</sup>), por ende, debe ser proporcionado continuamente por una fase gaseosa durante el funcionamiento del biorreactor. La TOD en el caldo depende de la VTO y de la VCO (Garcia-Ochoa et al., 2015, 2013a, 2010b).

La VTO es definida como la capacidad de transferencia de masa de gas-líquido del sistema del reactor y se sabe que es mayor al aumentar la agitación y la aireación. A través de un balance de oxígeno, la VTO puede ser determinada por medio de la siguiente ecuación (Garcia-Ochoa et al., 2010a; Garcia-Ochoa & Gomez, 2009):

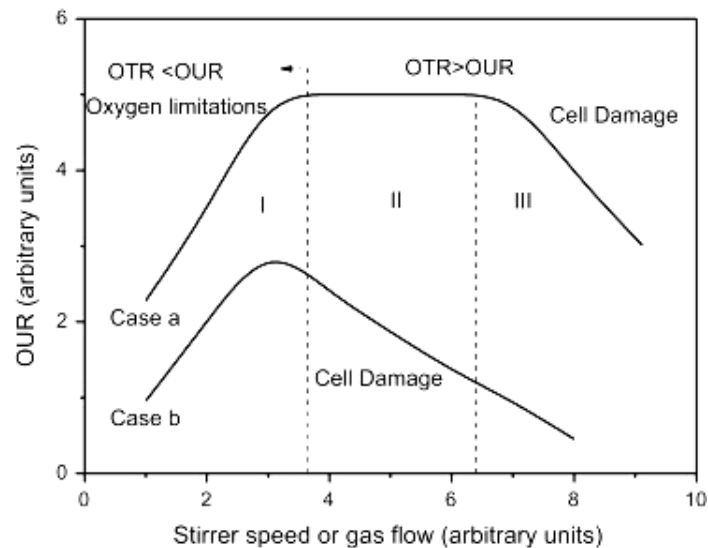
$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = k_L a * (C_{O_2}^* - C_{O_2}) - VCO \quad \text{Ecuación 1.1}$$

Donde la VTO depende del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ( $k_L a$ ), y la diferencia entre las concentraciones de oxígeno en equilibrio ( $C_{O_2}^*$ ) y en la fase líquida ( $C_{O_2}$ ). Se ha descrito que, la VTO y la VCO se encuentran correlacionadas entre sí, el más lento fija la velocidad de la otra etapa potencialmente más rápida. La Ecuación 1.1 representa la relación entre VCO y VTO. Como el término de acumulación ( $dC_{O_2} / dt$ ) suele tener un valor bajo, se puede suponer que  $VTO \approx VCO$ . Si el valor de  $k_L a$  tiene un valor grande, VTO se vuelve aproximadamente igual a VCO al disminuir la fuerza impulsada, es decir, el valor de la concentración del oxígeno disuelto aumenta.

Cabe destacar que, la VCO es una de las características fisiológicas fundamentales de los cultivos de microorganismos, cuyo valor cambia durante el cultivo debido al cambio en la población celular. Además, por otra parte, la VCO también puede proporcionar una cantidad considerable de información sobre la respuesta de las células a la dinámica de fluidos en el biorreactor. Por lo tanto, la VCO se ha utilizado para la estimación de la actividad celular, la concentración de células viables y el crecimiento de cultivos celulares.

La actividad respiratoria de las células es a menudo la primera respuesta fisiológica afectada por la presencia de una alta velocidad de cizallamiento (Hao et al., 2009). Por lo tanto, los valores de la  $qO_2$  pueden usarse como indicador de respuesta al efecto del estrés hidrodinámico en cultivos celulares en biorreactores (Garcia-Ochoa et al., 2011). Se sabe que cuando la velocidad de agitación o aireación aumentan, las fuerzas hidrodinámicas pueden afectar el cultivo modificando la actividad respiratoria de las células (Hao et al., 2009). En la

Figura 1.12 se muestra la influencia de la velocidad de agitación o la aireación en un reactor tipo tanque agitado sobre la VCO.



**Figura 1.12** Efecto teórico de la velocidad de agitación o aireación sobre la VCO en un Bioprocesos (Garcia-Ochoa et al., 2015).

En el caso a de la figura 1.12, se observa que, en condiciones de limitación de oxígeno, si hay una baja velocidad de agitación o aireación, la VCO está limitada por la VTO ( $VTO < VCO$ ). En este caso, al aumentar la VTO aumenta la VCO y por ende existirá un mejor crecimiento celular (zona I). Si la velocidad de agitación o aireación aumenta y deja de ser el paso limitante, se alcanza la meseta del sistema biológico y la VCO es constante (zona II). En condiciones de no limitación de oxígeno ( $VTO \geq VCO$ ), la VCO y la  $q_{O_2}$  pueden ser constantes e independientes de la agitación y/o aireación (zona II). Si la agitación aumenta más las fuerzas hidrodinámicas pueden afectar las células y se puede observar una disminución de la VCO y un daño celular debido a los efectos de cizallamiento (zona III). En caso b de la Figura 1.12, es posible que el daño celular pueda ocurrir antes de que la VCO se convierta en el paso límite, es decir, antes de que VTO alcance un valor igual a la VCO máxima. Por lo que un aumento de energía mejorará la eficiencia del bioproceso, aunque a cierto nivel de agitación las fuerzas hidrodinámicas podrían afectar a las células y la VCO disminuiría.

Para cuantificar los efectos de cizallamiento se han usado como indicador de estudio la morfología celular. Garcia-Ochoa y colaboradores estudiaron el efecto del estrés hidrodinámico en el crecimiento de *Xanthomonas campestris* en biorreactor, la cual puede producir un polisacárido similar a alginato llamado xantano. En este estudio, se investigó la velocidad de crecimiento y la producción de xantano bajo diferentes niveles de cizallamiento. Se observaron cambios morfológicos celulares dependiendo de las condiciones de agitación,

siendo evidentes las diferencias en la morfología a alto estrés de cizallamiento. Por otra parte, se ha descrito un método sencillo para evaluar el efecto de la velocidad de agitación y aireación en cultivos de *R. erythropolis* sobre la VTO, VCO y el daño celular mediante la determinación de la  $qO_2$ . García-Ochoa et al., (2015) encontraron que existen dos zonas que determinan el efecto de cizallamiento a través de la velocidad de agitación sobre la actividad respiratoria, una zona de no estrés donde la  $qO_2$  se mantiene constante y una zona de estrés celular en la que el valor de  $qO_2$  disminuye al aumentar la agitación. En cambio, al variar la aireación no hubo un efecto sobre la  $qO_2$ . Estos resultados, aportan valiosa información sobre el esfuerzo generado por las condiciones de hidrodinámica en el biorreactor.

En este trabajo se propone a la  $qO_2$  como un indicador de la respuesta celular a cambios de condiciones de dinámica de fluidos en el biorreactor, siendo su medición una técnica para conocer las condiciones de operación que pueden causar daño celular. Influencia de las condiciones hidrodinámicas sobre la  $qO_2$ .

Para identificar el rango óptimo de las condiciones de hidrodinámica para las células, se han estimado parámetros característicos de la mezcla turbulenta a diferentes condiciones de agitación. Se ha reportado que existen diversos factores que han sido determinados como inductores de estrés (Acedos et al., 2019a; Rodríguez et al., 2017; Escobar et al., 2016; Gomez et al., 2015; Garcia-Ochoa et al., 2015, 2013a).

Se sabe que un aumento de la agitación genera una mayor VTO, pero es capaz este de afectar las células, induciendo daño celular (García-Ochoa et al., 2020). Recientemente, en cultivos de *A. vinelandii* se estimó la microescala de Kolmogorov en dos escalas de biorreactor (3 y 30 L), sugiriéndose que las fuerzas hidrodinámicas no afectan mayormente a las células (García-Ochoa et al., 2015). Sin embargo, se requiere un estudio más detallado acerca del posible efecto hidrodinámico en cultivos de *A. vinelandii* sometidos a diferentes velocidades de agitación. Por otra parte, se conoce que bajo condiciones que exceden un determinado nivel de agitación en un cultivo, el factor de efectividad ( $\eta$ ) se utiliza para evaluar el proceso microbiano en el que se produce el daño celular. En *A. vinelandii* se ha estudiado este efecto solo en la producción de PHB. Se estableció que un aumento de PHB conlleva a un menor  $\eta$ . Sería interesante evaluar este parámetro sobre la síntesis de alginato y establecer una relación con la  $qO_2$ . En cultivos de *A. vinelandii* aún no se ha estudiado con detalle el efecto hidrodinámico por medio de cambios en la  $qO_2$  a través de cambios en la agitación y cómo se ven afectados los parámetros de hidrodinámica sobre la síntesis de alginato.

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se sabe que, *A. vinelandii* posee altas velocidades de respiración, pero aún no se conoce con certeza que efecto tiene la respiración celular sobre el crecimiento y la producción de alginato a nivel de caracterización fisicoquímica y expresión de genes claves en la biosíntesis del alginato en *A. vinelandii*.

En todos los estudios que han demostrado la influencia de la VTO (o VCO) sobre la producción de alginato en cultivos de *A. vinelandii* se ha evaluado la VTO a través de cambios en la velocidad de agitación. Estos trabajos se han realizado bajo condiciones donde un aumento del cizallamiento podría tener un efecto sobre el crecimiento celular. En este sentido, no existe evidencia experimental suficiente para descartar un posible efecto hidrodinámico sobre las células. Así, descartando este posible efecto, se podría evaluar de mejor manera la influencia de la  $qO_2$  sobre la calidad del alginato y la expresión de algunos genes claves involucrados en la biosíntesis de alginato.

Se conoce que la síntesis de alginato y PHB se encuentra estrechamente relacionada con el metabolismo respiratorio de *A. vinelandii*, por lo que sería interesante evaluar el efecto de las condiciones de hidrodinámica sobre la respiración celular y la calidad del alginato y PHB. Se sabe que, hay ciertas condiciones de cultivo donde el flujo de carbono va en un mayor porcentaje a la producción de alginato disminuyendo la síntesis del PHB y se podría observar claramente el efecto que tiene los cambios de agitación en la respiración celular y en la calidad de alginato. Además, existen algunas evidencias, en que una disminución en la síntesis de PHB disminuye el valor de la  $qO_2$  y esto podría tener un efecto hidrodinámico sobre las células. También, sabe que presenta un mayor rendimiento en la producción de alginato y puede alcanzar concentraciones superiores de alginato a las obtenidas hasta ahora con *A. vinelandii* silvestre.

Todo esto ayudaría a comprender proceso de respiración de *A. vinelandii* y el efecto en la calidad de alginato con el fin de obtener un producto de características conocidas y definidas, para así poder establecer un bioproceso que genere un producto con un mayor valor agregado y pueda ser utilizado en la industria con fines biomédicos y biotecnológicos.

### 3. HIPÓTESIS

Basados en los antecedentes que muestran que la calidad del alginato puede ser determinada por la respiración celular y que la  $qO_2$  puede ser propuesto como un parámetro indicador de estrés hidrodinámico.

Se establece la siguiente hipótesis: un aumento en la  $qO_2$  disminuirá el peso molecular de alginato sintetizado por células expuestas a diferentes condiciones de agitación sin sufrir daño subletal por la exposición a altos esfuerzo de corte.

### 4. OBJETIVOS

#### 4.1. Objetivo general:

Evaluar si las condiciones de hidrodinámica tienen un efecto sobre la respiración celular y la calidad del alginato, en cultivos de *A. vinelandii* ATCC 9046 expuestos a diferentes esfuerzos de corte.

#### 4.2. Objetivos específicos

1. Establecer un rango de condiciones hidrodinámicas (velocidad de agitación), a través de la velocidad de consumo de oxígeno ( $qO_2$ ) en cultivos de *A. vinelandii*.
2. Estudiar el efecto de la velocidad de consumo de oxígeno ( $qO_2$ ) sobre la calidad del alginato y los parámetros de respiración celular utilizando *A. vinelandii* mediante cultivos por lotes y en condiciones de diazotrofia.
3. Evaluar a nivel transcripcional algunos genes claves involucrados en la producción de alginato en cultivos de *A. vinelandii*.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1. Metodología experimental

#### 5.1.1. Microorganismo y preservación

El microorganismo que se utilizó fue *Azotobacter vinelandii* ATCC 9046. *A. vinelandii* se mantuvo congelada en crioviales con glicerol al 30 % a - 80°C. El stock de trabajo de la bacteria se mantuvo a - 20 °C.

#### 5.1.2. Preservación de *Azotobacter vinelandii*

La conservación de este microorganismo es a una temperatura de - 80°C.El procedimiento consta de las siguientes etapas:

- Crecer el microorganismo en medio de cultivo líquido (medio de cultivo utilizando sacarosa 20 g L<sup>-1</sup> como fuente de carbono y energía y sin fuente de nitrógeno) hasta que esté en la mitad de la fase de crecimiento (aproximadamente 24h).
- Previamente, esterilizar tubos crioviales de 2 mL (o nuevos estériles, listos para utilizar) y una solución de glicerol al 85%.
- Agregar a cada criovial 300 µL de glicerol y una alícuota de 700 µL de caldo de cultivo.
- El volumen final del tubo criovial es 1 mL, luego mezclar (agitar con la mano, NO USAR vórtex) y rotular con nombre, fecha de preparación del glicerol y el nombre de la persona que los ha preparado.
- Guardar los crioviales previamente preparados a 4°C durante 4 horas, luego a - 20°C durante 24 horas y finalmente traspasar a - 80°C.
- Dejar los crioviales necesarios para utilizarlos como microorganismos de trabajo los cuales se conservan a - 20°C.

### 5.1.3. Medio de cultivo

El medio de cultivo que se utilizó para la propagación de la bacteria y su cultivo en reactor, el cual es detallado en la Tabla 5.1.

**Tabla 5.1** Composición de medio de cultivo para *A. vinelandii* ATCC 9046 (Peña et al., 1997)

Compuesto	Fórmula molecular	Pureza (%)	Concentración (g L <sup>-1</sup> )
Sacarosa	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	≥ 99.9	20
Fosfato de potasio dibásico	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	≥ 99.9	0.66
Fosfato de potasio monobásico	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	≥ 99.9	0.16
Sulfato de calcio	CaSO <sub>4</sub>	≥ 99.9	0.05
Cloruro de sodio	NaCl	99.9	0.2
Sulfato de magnesio	MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	99.8	0.2
Molibdato de sodio	NaMoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	99.9	0.0029
Sulfato de hierro	FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	99.9	0.027

### 5.1.4. Preparación y esterilización del medio de cultivo

Para la elaboración del medio de cultivo se prepararon por separado tres soluciones: fosfatos de potasio y sacarosa; stock de sulfato de calcio (25 x); y un stock de sales (100 x). Con el fin de evitar la precipitación del FeSO<sub>4</sub>, las soluciones se esterilizaron por separado a 121 °C durante 20 minutos en un autoclave marca Lab-Tech, modelo LAC-5100SD; una vez frías se mezclaron en proporciones determinadas y en condiciones de esterilidad bajo mechero Bunsen. El pH de cada uno de los medios fue ajustado a 7.0 con una solución de NaOH 2 M.

### 5.1.5. Preparación y esterilización del medio de cultivo en el reactor

Para la preparación del medio de cultivo en el reactor, se prepararon por separado tres soluciones a diferentes proporciones: 1275 mL de fosfatos de potasio y sacarosa dentro del biorreactor; 60 mL de sulfato de calcio; 15 mL de componentes restantes. Con el fin de

evitar la precipitación del  $\text{FeSO}_4$ , las soluciones se esterilizan por separado a  $121\text{ }^\circ\text{C}$  durante 30 minutos. El reactor fue sellado de acuerdo con su configuración antes de ser esterilizado a  $121\text{ }^\circ\text{C}$  durante 30 minutos en un autoclave marca LabTech, modelo LAC-5100SD. Una vez frías se mezclaron dentro del reactor en condiciones de estériles. El pH del medio de cultivo (completo) fue ajustado a 7.2 con una solución NaOH 2 M la cual fue autoclavada por separado.

#### **5.1.6. Preparación del pre-inóculo.**

Para la preparación del inóculo, primero la bacteria *A. vinelandii* se propagó a partir de un criovial que contenía 1 mL de caldo de cultivo en placas de Petri con medio de cultivo mencionado anteriormente en la tabla 5.1, incorporando agar  $20\text{ g L}^{-1}$  y extracto de levadura  $3\text{ g L}^{-1}$ . Éstas se mantuvieron por 72 h en un incubador marca Lab-Tech modelo Memmert a  $30\text{ }^\circ\text{C}$ .

#### **5.1.7. Preparación de inóculos**

El inóculo para los cultivos en biorreactor se llevó a cabo en dos matraces Erlenmeyer de 500 mL con 100 mL de medio de cultivo, inoculados con células previamente crecidas obtenidas de placa de Petri. Estos matraces se incubaron a  $30\text{ }^\circ\text{C}$  y 200 rpm durante 22 horas o hasta alcanzar  $\frac{3}{4}$  de la concentración de biomasa definida previamente en matraces durante la etapa de crecimiento ( $1,0\text{ g L}^{-1}$ ) en un shaker orbital marca Lab-Tech modelo LSI-3016R.

## **5.2. Metodología analítica**

### **5.2.1. Determinación de la concentración de biomasa por método gravimétrico**

La concentración de biomasa se determinó mediante el método gravimétrico. Se tomaron 10 mL de caldo de cultivo al cual se adicionó 1 mL de EDTA 0,1 M y 1 mL de NaCl 1,0 M. Se centrifugó a 9000 rpm por 10 min en una centrifuga marca Hettich zentrifugen modelo Universal 320 R, luego el sobrenadante se guardó a -20 °C en un congelador. El pellet de biomasa se lavó tres veces con 10 mL de agua destilada. El pellet lavado se dejó secar en crisoles de cerámica previamente secados a 105 °C hasta peso constante en una estufa marca Lab-tech modelo Memmert. El pellet seco fue pesado en balanza analítica marca Radwag modelo AS 220/C/2 ya que por diferencia del peso del capacho (o crisol) antes de colocar la muestra y luego de secar la muestra a 105°C hasta peso constante y considerando el volumen de 10 mL, se obtiene la concentración celular (Ponce et al., 2021). Para estimar la biomasa de forma más rápida se realizó una curva de calibrado de biomasa presentada en el Anexo 1.

### **5.2.2. Determinación de la concentración de sacarosa por hidrólisis ácida-DNS**

El método colorimétrico se basa en la hidrólisis de la sacarosa usando HCl concentrado y la posterior medición de los azúcares reductores libres por la reducción con el ácido dinitrosalicílico (DNS) que reacciona con la sacarosa tras su hidrólisis química con HCl, formando un complejo nitroamino coloreado (amarillo), cuya densidad óptica es proporcional a la concentración de grupos reductores (Miller, 1959).

#### **5.2.2.1. Preparación reactivo DNS**

La solución de DNS se preparó pesando 1,6 g de hidróxido de sodio, 30 g de tartrato de sodio y 1 g de reactivo DNS de la siguiente manera. En un vaso precipitado de 200 mL se adicionaron 50 mL de agua destilada en donde se disuelve el hidróxido de sodio y el tartrato de sodio. La solución se calienta con agitación en una manta calefactora y se le agrega lentamente el reactivo DNS, una vez disuelto se pone a temperatura ambiente y se deja enfriar. La solución se aforó a 100 mL con agua destilada. El reactivo DNS fue almacenado en una botella ámbar envuelto en papel aluminio a temperatura ambiente.

### **5.2.2.2. Determinación de la concentración de sacarosa**

- Tomar 1 mL del sobrenadante de caldo de cultivo.
- Diluir convenientemente y 1 mL de cada dilución se mezcla con 0,1 mL de ácido clorhídrico concentrado (HCl) y se disponen los tubos eppendorf de 2 mL en un baño a 60°C durante 10 min.
- Retirar los tubos del baño y se les agrega 0,9 mL de hidróxido de sodio (NaOH) 1,7 N para neutralizar la reacción.
- Tomar 1 mL y agregar 1 mL la solución de DNS, posteriormente tapar los tubos y disponer en un baño a ebullición durante 5 min.
- Retirar los tubos del baño a ebullición y colocan en un baño de hielo en donde se agregó 10 mL de agua destilada a cada tubo.
- Medir la absorbancia de cada tubo a 540 nm usando como blanco la solución con sólo agua destilada.
- Los valores obtenidos de absorbancia se extrapolaron en la curva de calibrado de sacarosa realizada la cual se encuentra en el Anexo 2.

### **5.2.2.3. Curva de calibrado de sacarosa:**

- Preparar 100 mL de solución aforada estándar de sacarosa de 2 g/L con agua destilada.
- Preparar diferentes concentraciones que varíen entre 0,1 y 2 g/L, respectivamente.
- Tomar 1 mL de cada dilución anterior y mezclar con 0,1 mL de ácido clorhídrico concentrado, agitar y disponer los tubos en un baño a 60°C durante 10 min.
- Realizar un blanco en el cual se reemplaza la solución estándar por agua destilada.
- Retirar los tubos del baño y agregar 0.9 mL de hidróxido de sodio 1,7 N para neutralizar la reacción (agitar).
- Tomar 1 mL y agregar 1 mL de la solución de DNS, posteriormente, tapar los tubos, agitar con vórtex y disponer en un baño a ebullición durante 5 min.
- Retirar los tubos del baño a ebullición y colocar en un baño de hielo durante 5 minutos.
- Agregar 10 mL de agua destilada a cada tubo.
- Medir la absorbancia de cada tubo a 540 nm usando como blanco la solución con agua destilada.

### 5.2.3. Extracción y cuantificación del alginato

Se basa en la precipitación del alginato con isopropanol frío y una posterior cuantificación gravimétrica (Peña et al., 1997). La técnica se lleva a cabo de la siguiente manera:

- Tomar 10 mL del sobrenadante de caldo de cultivo y mezclar con 1 mL de EDTA 0,1 M y 1 mL de NaCl 1 M.
- Adicionar 30 mL de isopropanol frío (-20°C) (grado técnico), dejar reposar la solución durante 24 h a 4°C en un refrigerador marca Mademsa modelo NORDIK MR 480 PLUS para que se produzca la aparición del alginato.
- Filtrar la solución utilizando una bomba a vacío, en membranas Millipore de 0,22 µm previamente secadas a 80°C hasta peso constante y pesados en una balanza analítica marca Radwag modelo AS 220/C/2.
- Secar las membranas con el alginato filtrado en una estufa marca Lab-Tech modelo Memmert a 35°C hasta peso constante.
- Disponer las membranas secas en una desecadora durante 10 min y posteriormente se pesan en una balanza analítica marca Radwag modelo AS 220/C/2.
- Por diferencia de peso se obtiene la concentración de alginato.

### 5.2.4. Determinación peso molecular de alginato promedio

Para determinar el peso molecular del alginato se utiliza la técnica de cromatografía de exclusión molecular. Se analizaron las muestras en un sistema HPLC con una columna Ultrahydrogel 500 conectada a Ultrahidrogel lineal, acoplado a un detector de índice de refracción.

- Preparar una solución de alginato de aproximadamente 5 mg mL<sup>-1</sup> en NaNO<sub>3</sub> 0,1 M.
- Dejar reposar entre 24 a 48 h a temperatura ambiente.
- Filtrar la muestra utilizando filtros de jeringa de membrana Nylon de 0,22 µm de tamaño de poro.

#### 5.2.4.1. Curva de calibrado para determinar el peso molecular de alginato

Para realizar la curva de calibrado, como estándar se utilizaron pululanos de *Aureobasidium pullulans* con pesos moleculares en un rango de 22,8 a 778 kDa como estándares de la marca Shodex STANDARD (Díaz-Barrera et al., 2007). Se prepararon 3

soluciones estándar de  $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$  en  $\text{NaNO}_3$   $0,1 \text{ M}$  con diferentes pesos moleculares. Se utilizó una solución de  $\text{NaNO}_3$   $1 \text{ M}$  como fase móvil, un volumen de inyección de  $100 \mu\text{L}$ , a  $35^\circ\text{C}$  y un flujo de  $0,8 \text{ L min}^{-1}$ . Los valores de los cromatogramas obtenidos se interpolaron a la curva de calibrado de pesos moleculares para los estándares comerciales. La curva de calibrado se encuentra en el Anexo 3.

### **5.2.5. Determinación del contenido de ácido manurónico y ácido gulurónico**

La caracterización de la cadena de alginato en cuanto a la razón de ácido gulurónico y manurónico es realizada mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) con la técnica de reflectancia total atenuada (ATR).

- Utilizar entre 2 - 3 mg de alginato.
- Dejar reposar al menos por 5 h a  $-80^\circ\text{C}$  y luego liofilizar durante 72 h.
- Utilizar un espectrómetro (FT/IR-4600, Jasco) y las lecturas se realizan en un rango de longitud de onda de  $600 - 4000 \text{ cm}^{-1}$  y una resolución de  $2 \text{ cm}^{-1}$ .
- Para cada muestra, se realizaron 64 exploraciones.
- Limpiar el módulo con etanol y luego ejecutar un background con aire.
- Disponer la muestra sobre el visor y ajustar la prensa presionando la muestra contra el visor, verificando que el visor esté completamente cubierto por la muestra.
- Ejecutar la lectura, visualizando que el espectro infrarrojo tenga una definición pronunciada de los peaks.
- Utilizar el software KnowItAll para realizar una corrección de línea base a todos los espectrogramas obtenidos y una normalización de 100% a 10% (datos en transmitancia).
- Analizar los números de onda de  $1320 \text{ cm}^{-1}$  (weak-broad) y  $1290 \text{ cm}^{-1}$  (weak-shoulder), correspondientes a los enlaces de C-O stretching característicos del ácido gulurónico y ácido manurónico, respectivamente (Sartori et al., 1997; Filippov & Kohn, 1974).
- La razón G/M fue calculada dividiendo los valores obtenidos de la transmitancia a los números de onda mencionados.

### **5.2.6. Determinación del grado de acetilación del alginato**

Para la medición del grado de acetilación, se determina el contenido de grupos acetil en la molécula (Díaz-Barrera et al., 2017). Para ello:

- Pesar 10 mg de alginato y disolver en 500  $\mu\text{l}$  de agua MilliQ.
- Adicionar 500  $\mu\text{l}$  de una solución 1 N de hidróxido de sodio (NaOH) e incubar a 80°C por 2 horas.
- Enfriar las muestras a temperatura ambiente y acidificar mediante la adición de 625  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  1,5 M.
- Centrifugar la muestra a 10.000 rpm durante 15 minutos en una centrifuga para tubos eppendorf.
- Separar y conservar la fase líquida resultante de la centrifugación para la cuantificación de acetato en un sistema HPLC.

#### **5.2.6.1. Curva de calibrado para determinar el grado de acetilación de alginato**

Para realizar la curva de calibrado, se utilizará como estándar ácido acético a diferentes concentraciones 40 y 350  $\text{mg mL}^{-1}$  utilizando una columna Aminex HPX-87H marca Bio-rad, acoplado a un detector UV Serie 200, marca Perkin Elmer. Se utilizó una longitud de onda de 215 nm, con ácido sulfúrico 0.005 M como fase móvil, un volumen de inyección de 20  $\mu\text{L}$ , a una temperatura de trabajo de 35°C y un flujo de 0,6  $\text{L min}^{-1}$ . El tiempo de corrida de cada muestra fue de 33 min. Los valores del área obtenida en cada muestra se interpolaron en una curva de calibrado de ácido acético preparada previamente en el Anexo 5.

#### **5.2.7. Cuantificación del contenido de PHB**

La cuantificación de PHB se llevó a cabo mediante la hidrólisis ácida obteniendo ácido crotonico por tratamiento con ácido sulfúrico concentrado para una posterior medición por HPLC acoplado a un detector UV (Díaz-Barrera et al., 2016).

- Pesar entre 2,5 y 3,5 mg de biomasa seca en tubos eppendorf de 2 mL y adicionar 1 mL de ácido sulfúrico concentrado (marca Winkler).
- Incubar la muestra a 90 °C y 700 rpm durante 1 h, en un Thermo-Shaker marca Biosan modelo TS-100.
- Posteriormente, enfriar las muestras y se diluyeron diez veces con agua MilliQ.
- Filtras las muestras utilizando filtros de jeringa de membrana de PDVF con un tamaño de poro de 0,22  $\mu\text{m}$ .
- Analizar las muestras ya filtradas por un sistema HPLC con una columna Aminex HPX-87H marca Bio-rad, acoplado a un detector UV Serie 200, marca Perkin Elmer.

- Se utilizó una longitud de onda de 215 nm, con ácido sulfúrico 0,005 M como fase móvil, un volumen de inyección de 20 µL, a una temperatura de 35 °C y un flujo de 0.6 L min<sup>-1</sup>. Los valores obtenidos se interpolaron a la curva de calibrado de ácido crotonico marca SIGMA en un rango de 5 mg L<sup>-1</sup> a 160 mg L<sup>-1</sup> la cual se encuentra en el Anexo 4.

### 5.2.8. Determinación de la expresión génica

El ARN se aisló de células cultivadas utilizando un kit de aislamiento de ARN de alta pureza (Roche Life Sciences, Alemania) y se trató con ADNasa libre de ARNasa (Roche) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. El ARN se cuantificó utilizando un sistema BioSpec-nano. La transcripción inversa-PCR en tiempo real se realizó con los cebadores utilizados para *alg8*, *alg44*, *algL*, *alyA1*, *alyA2*, *alyA3*, *algE7*, *cydA*, *algV*, *algU*, *nifH*, *rpoS* y *gyrA*.

El ADNc se sintetizó utilizando un kit de síntesis de ADNc de primera hebra RevertAid H Minus (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Para RT-qPCR, se retrotranscribieron 100 ng de ARN total.

La PCR en tiempo real se realizó en un sistema de PCR en tiempo real AriaMx (Agilent Technologies, EE. UU.) utilizando Brilliant II SYBR@ Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies, EE. UU.).

Las muestras se desnaturalizaron durante 5 min a 95 °C. Se utilizaron cuarenta ciclos de amplificación para PCR en tiempo real con transcripción inversa (95 °C durante 15 s, 59 °C durante 15 s y 72 °C durante 15 s)(Ponce et al., 2021).

El análisis de la curva de fusión confirmó la amplificación de un solo producto para cada par de cebadores. Los resultados se analizaron utilizando el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Schmittgen & Livak, 2008; Livak & Schmittgen, 2001)

Los valores de expresión génica relativa se normalizaron utilizando *gyrA* como gen de mantenimiento, y se informan como los cambios en el pliegue con respecto a los niveles de transcripción de cultivos a diferentes velocidades de agitación(Díaz-Barrera et al., 2017). A continuación, en la Tabla 5.2 se muestra el diseño de cebadores utilizados en esta investigación.

**Tabla 5.2** Diseño de cebadores para la expresión génica por qPCR en tiempo real

Genes	Cebadores	Genes	Cebadores
<i>alg8-F</i>	5'-TGTTGAACCAGCTCTGGAAG-3'	<i>alg8-R</i>	5'-CCTACCCGCTGATCCTCTAC-3'
<i>alg44-F</i>	5'-CGACAACCTTCACCGAAGGG-3'	<i>alg44-R</i>	5'-TGACGAAGTAGAGGTCGTAGAG-3'
<i>algE7-F</i>	5'-AGATAGGTGCGGTTGGTTTC-3'	<i>algE7-R</i>	5'-CTCCGACCTGATTCTCGATT-3'
<i>algL-F</i>	5'-GCCCAGTAGGAGTGGTTGTT-3'	<i>algL-R</i>	5'-CTGAAATTCTCCAGTTGCA-3'
<i>alyA1-F</i>	5'-CGGTCGGTATTGCACATAGA-3'	<i>alyA1-R</i>	5'-CAAGATCCACCGTTTGAGTG-3'
<i>alyA2-F</i>	5'-AACTGAGTGCAACCTTGACG-3'	<i>alyA2-R</i>	5'-GCTGCACGTTGATCTTGAAT-3'
<i>alyA3-F</i>	5'-GCCTCCTCAACTTCTGCAAC-3'	<i>alyA3-R</i>	5'-TACCTTGTCATCCCCACCAT-3'
<i>nifH-F</i>	5'-GCC GAA AAG ATC ACC AAC GA-3'	<i>nifH-R</i>	5'-ATA GGC GCC GTT TTC TTC CA-3'
<i>cydR-F</i>	5'-CCT CCG AAG AGC AGA TCA AG-3'	<i>cydR-R</i>	5'-GCA GAC AAA CAG GAT GAG CA-3'
<i>algU-F</i>	5'-TCT CGG TTT GAT CGT GCG TT-3'	<i>algU-R</i>	5'-GAG ACG CCA TGA TCA GCT TA-3'
<i>rpoS-F</i>	5'-CCT CAA CGA AAT CGG CTT CT-3'	<i>rpoS-R</i>	5'-AGT CGC AGG TTG CTT TCG AT-3'
<i>gyrA-F</i>	5'-ACCTGATCACCGAGGAAGAG-3'	<i>gyrA-R</i>	5'-AGGTGCTCGACGTAATCCTC-3'

### 5.2.9. Determinación de la morfología celular utilizando SEM

Se observó la morfología celular mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) a diferentes tiempos de cultivo. Las muestras se prepararon mediante lo descrito por Shapiro, (1987).

### 5.2.10. Determinación de la viscosidad

Para la determinación de la viscosidad del cultivo y del alginato, se utilizó un viscosímetro Brookfield Synchroelectric-LVT, utilizando el husillo número 18, a 30°C. Se consideró que la viscosidad del caldo depende de la concentración del alginato producida para cada velocidad de agitación utilizada (García-Ochoa et al., 2013b).

### 5.3. Preparación de hidrogeles de alginato bacteriano

#### 5.3.1. Formación de hidrogeles de alginato bacteriano con reticulación iónica

Se obtuvieron diferentes tipos de alginato seco con diferentes pesos moleculares los cuales fueron clasificados en tres tipos: alto peso molecular, medio peso molecular y bajo peso molecular. Se pesaron 20 mg y 100 mg de alginato seco el cual fue sometido a una reticulación iónica de CaCl al 2% p v<sup>-1</sup> para formar el hidrogel de alginato bacteriano (Figura 5.1.).



**Figura 5.1** Esquema representativo de formación de hidrogeles de alginato con reticulación iónica.

#### 5.3.2. Prueba de estabilidad de hidrogeles de alginato bacteriano

Se pesaron 20 mg de alginato seco triturado homogéneamente, a eso se le añadió 1 mL agua MilliQ y se mezcló durante una hora en un baño de ultrasonido a temperatura ambiente. Luego se añadió 4 mL de la solución de CaCl al 2% p v<sup>-1</sup> y se dejó inmerso el hidrogel en esa solución durante 24 h a temperatura ambiente. Posteriormente se retiró el hidrogel de la solución líquida. Luego la muestra se lava 3 veces con agua MilliQ, después de cada lavado se mezcla durante treinta minutos. Finalmente, el hidrogel se deja deshidratando a temperatura ambiente (Figura 5.2).



**Figura 5.2** Esquema de estabilidad de hidrogeles de alginato.

### 5.3.3. Microscopía electrónica de Barrido (SEM)

Se utilizó microscopía electrónica de barrido (SEM) para examinar la microestructura de los hidrogeles de alginato utilizando un microscopio electrónico de barrido (FEI Co., EE. UU) (Funes et al., 2023).

### 5.3.4. Cuantificación de espectros de hidrogeles de alginato por FTIR-ATR

Los espectros infrarrojos de hidrogeles de alginato se obtuvieron utilizando un espectrómetro infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR) (IRaffinity-1S, Shimadzu) y el método ATR con un prisma de germanio (MIRacle 10, Shimadzu) en el rango de 4000–700  $\text{cm}^{-1}$ . Los patrones de difracción de rayos X en polvo (DRX) se adquirieron utilizando un difractómetro Bruker D8 Endeavor equipado con un anticátodo de Cu (radiación  $\text{K}\alpha$ , que opera a 40 kV - 40 mA).

## 5.4. Determinación experimental de parámetros de transferencia y consumo de oxígeno

### 5.4.1. Calibración sensor de oxígeno disuelto

Se utilizaron dos biorreactores, uno de 3 L (Applikon, Schiedam, Países Bajos) y otro de 2 L (Sartorius BBI Systems, modelo BIOSTAT® B plus) utilizando un volumen de trabajo de 1,5 L. La bacteria se cultivó en el medio de cultivo descrito anteriormente. El cultivo se llevó a cabo a 30 °C con un flujo de aire de 1,5  $\text{L min}^{-1}$  (1,0 vvm) a pH  $7,2 \pm 0,1$ , controlado automáticamente mediante la adición de NaOH 2 M. El biorreactor se operó a 50,100,150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900 y 1000 rpm. La TOD se midió con un

sensor de oxígeno polarográfico (Applikon, AppliSens y Hamilton) y no se controló. El sensor de TOD se calibró con el medio de cultivo (30 °C) con aire para alcanzar una lectura de 100% y con nitrógeno para obtener una lectura de 0%. Para cada velocidad de agitación se realizó previamente una calibración por triplicado con el fin de tener una buena lectura.

#### 5.4.2. Determinación de $k_La$

Para cuantificar el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ( $k_La$ ) se utilizó el método dinámico sin células. Este método consiste en suministrar aire hasta que el sistema alcance una saturación de oxígeno en el líquido. Luego se cortó el suministro de aire y se introdujo una corriente de nitrógeno en el sistema, registrándose una disminución de la concentración de oxígeno disuelto en función del tiempo. Finalmente, se restableció el flujo de aire a un valor estable. En ambos casos la pendiente de la gráfica corresponde al valor de  $k_La$  (García-Ochoa et al., 2010b).

#### 5.4.3. Corrección del tiempo de respuesta del electrodo de oxígeno disuelto

Se determinó el tiempo de respuesta del electrodo (tiempo necesario para alcanzar el 63 % de la lectura final de la TOD) transfiriendo el sensor del recipiente con medio de cultivo burbujeado con nitrógeno (0 %) al biorreactor burbujeado con aire (100 % de saturación). Se asumió que la respuesta del electrodo seguía una cinética de primer orden. La ecuación utilizada fue la reportada por (Padilla-Córdova et al., 2020).

#### 5.4.4. Determinación de la VTO

Se determinó la VTO a partir de los valores de  $k_La$  obtenidos, de acuerdo con la siguiente ecuación reportada (García-Ochoa et al., 2009):

$$VTO = k_La * (C^* - C_L) \quad \text{Ecuación 5.1}$$

Donde:

VTO: Velocidad de transferencia de oxígeno ( $\text{mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$ )

$k_La$  : Coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ( $\text{h}^{-1}$ )

$C^*$  : Concentración de oxígeno disuelto en equilibrio ( $\text{mmol L}^{-1}$ )

$C_L$  : Concentración de oxígeno disuelto obtenido desde la TOD en ( $\text{mmol L}^{-1}$ )

#### **5.4.5. Determinación experimental de la VCO método dinámico**

La determinación experimental de la VCO se puede realizar aplicando el método dinámico con células. Este método se basa en la técnica propuesta por Bandyopadhyay et al., (1967) la cual mide la actividad respiratoria de las bacterias que están creciendo activamente en el biorreactor. Se suministra una corriente de aire saturado al biorreactor, luego se inocula el biorreactor con células en fase de crecimiento (10% v/v del volumen de trabajo del biorreactor). Se cierra el suministro de aire y la concentración de oxígeno disuelto disminuirá de manera igual al consumo de oxígeno por la respiración de los microorganismos.

De esta manera, la VCO se obtuvo a través de la pendiente de la gráfica de la concentración de oxígeno disuelto (después de cerrar el flujo de aire) en función del tiempo. La concentración de biomasa fue de 0,1 g L<sup>-1</sup> para todas las condiciones experimentales y los experimentos fueron realizados por cuadruplicado para asegurar un buen ajuste.

#### **5.4.6. Determinación experimental de la VCO método dinámico modificado**

Para determinar experimentalmente el valor de  $qO_2$  se aplicó el método dinámico modificado reportado por Gomez et al., (2006). Este método requiere interrumpir el flujo de aire y una concentración de oxígeno disuelto en el caldo de cultivo. En los cultivos de *A. vinelandii*, el oxígeno disuelto durante la fase de crecimiento es cercano a cero. Por esta razón, se introdujo una modificación que consiste en inyectar oxígeno puro durante 10 segundos, asegurando que la concentración no supere el 20%. La evolución de la TOD tras el pulso permite estimar la  $qO_2$  a partir de la biomasa presente en ese momento. Bajo estas mismas condiciones, se cuantificó también la velocidad de consumo de oxígeno (VCO).

#### **5.4.7. Método de correlación empírica para la determinación de $k_La$**

La obtención de la correlación empírica del  $k_La$  se realizó utilizando el biorreactor empleado en los cultivos correspondientes al Objetivo 2.

El estudio consideró la variación de tres variables independientes: la velocidad superficial de paso de gas o flujo de aireación ( $V_s$ ), la velocidad de agitación (N) y la viscosidad aparente del medio ( $\mu_a$ ) (Garcia-Ochoa & Gomez, 2009; Puthli et al., 2005; Zhu et al., 2001; Van't Riet, 1979). Para ello, se empleó el medio de cultivo líquido descrito en la

Tabla 5.1. La variación en la viscosidad aparente se logró mediante la adición de alginato bacteriano producido previamente a la condición de 500 rpm.

Una vez obtenidos los valores de oxígeno disuelto bajo distintas combinaciones de velocidad de agitación y flujo de aireación, se procedió a reducir progresivamente la viscosidad del medio. Esto se realizó mediante el retiro de 200 mL del cultivo contenido en el biorreactor y la incorporación de un volumen equivalente de medio de cultivo líquido fresco, libre de alginato disuelto.

La determinación de la correlación empírica del  $k_L a$  fue realizada a través del modelo potencial mostrada en la ecuación 5.2:

$$k_L a = C * V_s^\alpha * N^\beta * \mu_a^\gamma \quad \text{Ecuación 5.2}$$

Donde se obtuvieron los parámetros  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  mediante regresión lineal simple, utilizando la ecuación linealizada 5.3.

$$\ln(k_L a) = \ln(C) + \alpha \ln(V_s) + \beta \ln(N) + \gamma \ln(\mu_a) \quad \text{Ecuación 5.3}$$

Donde:

$k_L a$ : Coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ( $s^{-1}$ )

$V_s$ : Velocidad superficial de paso de gas o flujo de aireación ( $m s^{-1}$ )

$N$ : Velocidad de agitación (rps)

$\mu_a$ : Viscosidad aparente ( $Pa*s$ )

Utilizando la Ecuación 5.3, se realizaron regresiones lineales simples con el objetivo de determinar los exponentes asociados a cada una de las variables del  $k_L a$ . Para obtener el parámetro  $\alpha$ , fue necesario trabajar con  $N$  y  $\mu_a$  constantes (Ecuación 5.4), para determinar el parámetro  $\beta$ , se debe trabajar con  $V_s$  y  $\mu_a$  constantes (Ecuación 5.5) y para determinar el parámetro  $\gamma$ , se debe trabajar con  $V_s$  y  $N$  constantes (Ecuación 5.6).

$$\ln(k_L a) = A + \alpha \ln(V_s) \quad \text{Ecuación 5.4}$$

$$\ln(k_L a) = B + \beta \ln(N) \quad \text{Ecuación 5.5}$$

$$\ln(k_L a) = L + \gamma \ln(\mu_a) \quad \text{Ecuación 5.6}$$

Estos cálculos individuales no solo permitieron estimar los exponentes, sino que también verificaron la consistencia de los datos experimentales. Las líneas obtenidas en cada regresión deberían ser aproximadamente paralelas, ya que su pendiente representa el exponente correspondiente. La presencia de pendientes divergentes podría indicar la existencia de valores atípicos o errores experimentales que interfieran con el ajuste global. Posteriormente, y mediante regresión lineal múltiple utilizando el programa Origin 2021, se obtuvo la correlación empírica definitiva.

## 5.5. Determinación de variables

### 5.5.1. Determinación de la velocidad específica de crecimiento de biomasa

Para el cálculo de la velocidad específica de crecimiento de biomasa se empleó el modelo logístico, determinado mediante Excel por la aplicación Solver, la cual ha sido previamente descrita en cultivos de *A. vinelandii* (Klimek & Ollis, 1980), la cual se presenta en la ecuación 5.7:

$$\frac{dX}{dt} = \mu * X * \left(1 - \frac{X}{X_{m\acute{a}x}}\right) \quad \text{Ecuación 5.7}$$

Donde:

$X$  : Concentración de biomasa ( $\text{g L}^{-1}$ ).

$X_{m\acute{a}x}$  : Concentración máxima de biomasa ( $\text{g L}^{-1}$ ).

$\mu$  : Velocidad específica de crecimiento ( $\text{h}^{-1}$ ).

### 5.5.2. Determinación de rendimientos

Los rendimientos fueron calculados en base a los datos experimentales obtenidos en cada uno de los cultivos realizados.

a) Rendimiento de sacarosa en biomasa:

$$Y_{x/s} = \frac{X(t) - X_0}{S_0 - S(t)} \quad \text{Ecuación 5.8}$$

b) Rendimiento de biomasa en alginato:

$$Y_{Alg/x} = \frac{Alg(t) - Alg(t_0)}{X_0 - X(t)} \quad \text{Ecuación 5.9}$$

c) Rendimiento de sacarosa en alginato:

$$Y_{Alg/s} = \frac{Alg(t) - Alg(t_0)}{S_0 - S(t)} \quad \text{Ecuación 5.10}$$

d) Rendimiento de sacarosa en PHB:

$$Y_{PHB/s} = \frac{PHB(t) - PHB(t_0)}{S_0 - S(t)} \quad \text{Ecuación 5.11}$$

Donde:

- $Y_{x/s}$  : Rendimiento de sustrato en biomasa ( $\text{g biomasa g sacarosa}^{-1}$ ).
- $Y_{Alg/s}$  : Rendimiento de sustrato en alginato ( $\text{g alginato g sacarosa}^{-1}$ ).
- $Y_{Alg/x}$  : Rendimiento de alginato por unidad de biomasa ( $\text{g alginato g biomasa}^{-1}$ ).
- $Y_{PHB/s}$  : Rendimiento de sustrato en PHB ( $\text{g alginato g sacarosa}^{-1}$ ).
- $X_0$  : Biomasa en el tiempo inicial ( $\text{g L}^{-1}$ ).
- $X(t)$  : Biomasa máxima en el tiempo ( $\text{g L}^{-1}$ ).
- $S_0$  : Sustrato en el tiempo inicial ( $\text{g L}^{-1}$ ).
- $S(t)$  : Sustrato en el tiempo final ( $\text{g L}^{-1}$ ).
- $Alg(t_0)$  : Alginato en el tiempo inicial ( $\text{g L}^{-1}$ ).
- $Alg(t)$  : Alginato máximo en el tiempo ( $\text{g L}^{-1}$ ).
- $PHB(t_0)$  : PHB en el tiempo inicial ( $\text{g L}^{-1}$ ).
- $PHB(t)$  : PHB máximo en el tiempo ( $\text{g L}^{-1}$ ).

### 5.5.3. Determinación de velocidades específicas

Las velocidades específicas de consumo de sacarosa y oxígeno fueron calculadas en base a los datos experimentales.

a) Velocidad específica de consumo de sacarosa:

$$q_s = \frac{1}{X(t)} \frac{S(t) - S_0}{t - t_0} \quad \text{Ecuación 5.12}$$

b) Velocidad específica de consumo de oxígeno (calculada a diferentes tiempos del cultivo):

$$q_{O_2} = \frac{VCO}{X(t)} \quad \text{Ecuación 5.13}$$

Donde:

- $q_s(t)$  : Velocidad específica de consumo de sacarosa ( $\text{g}_{\text{sacarosa}} \text{g}_{\text{biomasa}}^{-1} \text{h}^{-1}$ )  
 $S_o$  : Sustrato en el tiempo inicial ( $\text{g L}^{-1}$ ).  
 $S(t)$  : Sustrato en el tiempo final ( $\text{g L}^{-1}$ ).  
 $qO_2$  : Velocidad específica de consumo de oxígeno ( $\text{mmol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ )  
 $X(t)$  : Biomasa en el tiempo ( $\text{g L}^{-1}$ ).  
 $VCO$  : Velocidad de consumo de oxígeno ( $\text{mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ).  
 $X$  : Concentración de biomasa durante el cultivo ( $\text{g L}^{-1}$ ).

#### 5.5.4. Determinación de productividades

- a) Productividad volumétrica de alginato:

$$Q_{Alg} = \frac{Alg(t) - Alg(t_o)}{t - t_o} \quad \text{Ecuación 5.14}$$

- b) Productividad específica de producción de alginato:

$$q_{Alg} = \frac{1}{X(t)} \frac{Alg(t) - Alg(t_o)}{t - t_o} \quad \text{Ecuación 5.15}$$

- c) Productividad volumétrica de PHB:

$$Q_{PHB} = \frac{PHB(t) - PHB(t_o)}{t - t_o} \quad \text{Ecuación 5.16}$$

Donde:

- $Q_{Alg}$  : Productividad volumétrica de alginato ( $\text{g}_{\text{alginato}} \text{L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ).  
 $q_{Alg}$  : Productividad específica de alginato ( $\text{g}_{\text{alginato}} \text{g}_{\text{biomasa}}^{-1} \text{h}^{-1}$ ).  
 $Alg(t_o)$  : Alginato en el tiempo inicial ( $\text{g L}^{-1}$ ).  
 $Alg(t)$  : Alginato máximo en el tiempo ( $\text{g L}^{-1}$ ).  
 $X(t)$  : Biomasa en el tiempo ( $\text{g L}^{-1}$ ).  
 $Q_{PHB}$  : Productividad volumétrica de PHB ( $\text{g}_{\text{PHB}} \text{L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ).  
 $PHB(t_o)$ : PHB en el tiempo inicial ( $\text{g L}^{-1}$ ).  
 $PHB(t)$  : PHB máximo en el tiempo ( $\text{g L}^{-1}$ ).

### 5.5.5. Determinación de poder viscosificante

El poder viscosificante fue evaluado en función de la viscosidad de la solución a distintas concentraciones de alginato. Los datos obtenidos se ajustaron a un modelo exponencial de la forma (Peña et al., 2011):

$$\eta = a * e^{b*c} \quad (\text{Ecuación 5.17})$$

Donde:

$\eta$  : Viscosidad de alginato en (mPa\*s)

$c$  : Concentración de alginato (g L<sup>-1</sup>)

$a$  y  $b$  : parámetros empíricos obtenidos mediante regresión no lineal utilizando Microsoft Excel.

### 5.5.6. Determinación de parámetros hidrodinámicos

a) Determinación de la potencia de entrada:

-  
-

$$N_p = \frac{P_0}{\rho * N^3 * D^5} \quad \text{Ecuación 5.18}$$

b) Determinación de la potencia real de entrada del impulsor:

$$P = \alpha \left( \frac{P_0^2 * N * D^3}{Q^{0,56}} \right)^\beta \quad \text{Ecuación 5.19}$$

\*Los parámetros  $\alpha$  y  $\beta$  dependen del sistema del impulsor.

c) Determinación de la energía de disipación promedio:

$$\varepsilon_{promedio} = \frac{P}{\rho * V} = \frac{P}{\rho * \frac{\pi}{4} * T^2 * H} \quad \text{Ecuación 5.20}$$

d) Determinación de la microescala de longitud de Kolmogorov

$$\lambda_s = \left( \frac{v^3}{\varepsilon} \right)^{\frac{1}{4}} \quad \text{Ecuación 5.21}$$

e) Determinación velocidad de la punta del impulsor

$$v_{punta} = \pi * N * D \quad \text{Ecuación 5.22}$$

f) Determinación de la velocidad de corte promedio y máxima

$$\gamma_{promedio} = \left( \frac{4 * N_p * \rho_L * D^2}{27 * \pi * \mu_{efectiva}} \right)^{\frac{1}{2}} * N^{\frac{3}{2}} \quad \text{Ecuación 5.23}$$

$$\gamma_{máxima} = 3,3 * N^{\frac{3}{2}} * D * \left( \frac{\rho_L}{\mu_{efectiva}} \right)^{1/2} \quad \text{Ecuación 5.24}$$

g) Determinación de la tensión de corte

$$\tau_t = \mu_{efectiva} * \gamma_{promedio} \quad \text{Ecuación 5.25}$$

Donde:

- $N_p$  : Número de potencia (Adimensional)
- $P$  : Potencia real de entrada (W)
- $\lambda_s$  : Escala de longitud de Kolmogorov (m)
- $\epsilon_{promedio}$  : Energía de disipación promedio (W kg<sup>-1</sup>)
- $v_{punta}$  : Velocidad de la punta del impulsor (m s<sup>-1</sup>)
- $\gamma_{promedio}$  : Velocidad de corte promedio (s<sup>-1</sup>)
- $\gamma_{máxima}$  : Velocidad de corte máxima (s<sup>-1</sup>)
- $\tau_t$  : Tensión de corte (N m<sup>-2</sup>)
- $\nu$  : Viscosidad cinemática (m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>)
- $\mu_{efectiva}$  : Viscosidad del líquido (Pa\*s)
- $\rho$  : Densidad (kg m<sup>-3</sup>)
- $V$  : Volumen (m<sup>3</sup>)
- $T$  : Diámetro del recipiente (m)
- $H$  : Altura del recipiente (m)
- $P_0$  : Potencia de entrada (W)
- $N$  : Velocidad de agitación (rpm)
- $D$  : Diámetro del agitador (m)

## 5.6. Equipamiento

### 5.6.1. Descripción del sistema de fermentación

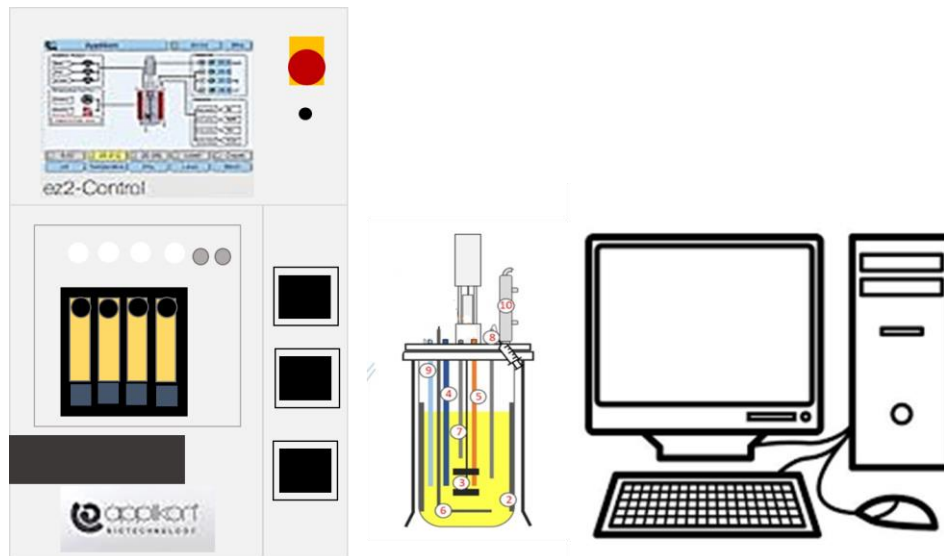
#### 5.6.1.1. Biorreactor marca Applikon

Se utilizó un reactor Applikon de 3 L de volumen total con 1,5 L de volumen útil, marca Applikon modelo ez2-Control el cual puede configurar, controlar y adaptar fácilmente parámetros tales como el pH, la temperatura, el oxígeno disuelto, la agitación, la espuma y el nivel para optimizar el bioproceso. Posee un control total del flujo de gas para reducir el esfuerzo de cizalla para los cultivos celulares.

Este reactor se encuentra equipado con dos impulsores turbina Rushton, tres baffles y un difusor de aire con siete orificios (Figura 5.3). El pH y la tensión de oxígeno disuelto (TOD) fueron monitoreados utilizando un electrodo de pH electroquímico tradicional o de un solo uso donde su rango de medición varía 0-14 pH y cuenta con una precisión 0,01 pH. También se utilizó un electrodo polarográfico tradicional, LumiSens o de un solo uso donde su rango de medición va entre saturación 0 - 100 % con una precisión 0,1 % respectivamente, ambos de la marca Applikon AppliSens. El pH fue controlado a 7.2 utilizando un controlador integrado a la consola Applikon ez2-Control. Las dimensiones geométricas del biorreactor se presentan en la Tabla 5.3.

**Tabla 5.3** Dimensiones geométricas del biorreactor

Parámetro	Longitud (cm)
Altura del biorreactor (H)	22
Diámetro tanque (T)	13
Diámetro impulsor (Di)	4,5
Distancia entre impulsores (E)	4
Ancho de baffles	1,5



**Figura 5.3** Esquema del montaje del sistema de reactor y equipos auxiliares.

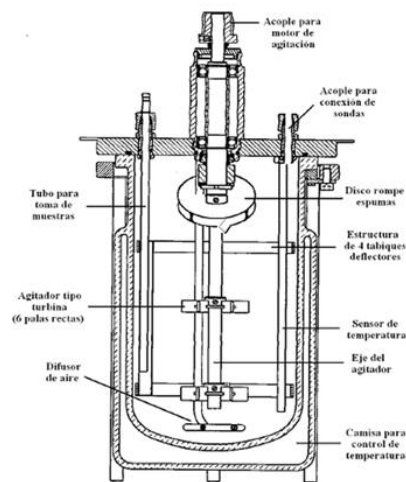
Nomenclatura biorreactor:

1. Biorreactor Applikon
2. Baffles
3. Impulsor tipo Rushton (4,5 cm Ø)
4. Sensor de TOD
5. Electrodo de pH
6. Difusor de aire
7. Sensor de Temperatura
8. Toma de muestra
9. Sistema de control de temperatura
10. Condensador para salida de gases

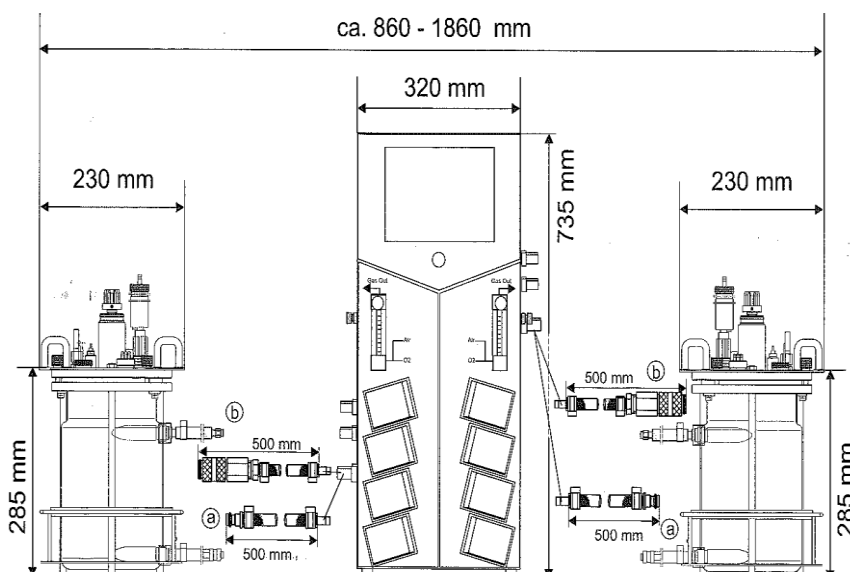
#### **5.6.1.2. Biorreactor marca Sartorius**

Se utilizó un biorreactor de 2 L de volumen total con 1,5 L de volumen útil marca Sartorius BBI Systems, modelo BIOSTAT® B plus el cual posee una torre de control que incluye los módulos de aireación, bombeo y control de la temperatura (Figura 5.4 y 5.5). Este reactor se encuentra equipado con dos impulsores turbina Rushton, cuatro baffles y un difusor de aire con doce orificios. El pH y la TOD fueron monitoreados utilizando un electrodo de pH marca Hamilton modelo EasyFerm Bio donde su rango de medición varía 0-14 pH. El sensor de TOD Hamilton es un sensor polarográfico especializado adecuados para mediciones de oxígeno gaseoso disuelto donde su rango de medición va entre saturación 0 - 100 %.

El control de temperatura (en un rango máximo de 0 - 100 °C) se lleva a cabo mediante un sensor Pt-100 con un error de  $\pm 0,1$  °C. La temperatura se regula mediante la circulación de agua desionizada por un circuito cerrado gracias al equipo de refrigeración y recirculación de agua FRIGOMIX® 1000, de Sartorius. Mediante este sistema también se realiza la circulación de agua a través del condensador del fermentador.



**Figura 5.4** Representación de biorreactor Sartorius BBI Systems, modelo BIostat® B plus: estación de control conectada a un reactor de 2 L. Esquema del biorreactor de Sartorius señalando sus componentes.



**Figura 5.5** Esquema de la instalación de Sartorius BBI Systems, modelo BIostat® B plus: estación de control conectada a dos biorreactores de 2 L.

### **5.6.1.3. Calibración del electrodo de pH**

El sensor de pH fue calibrado previo a la esterilización del biorreactor. Se utilizaron soluciones patrón de pH 4,0 y 7,0. El procedimiento se realizó 3 veces.

### **5.6.1.4. Calibración del sensor de oxígeno disuelto**

Luego de haber polarizado el sensor de oxígeno disuelto por al menos 8 horas y que la temperatura del reactor me mantuviera a 30°C, se procedió a su calibración. Para calibrar al 100% se hizo pasar un flujo de aire hasta saturar el medio de cultivo y posteriormente se incorporó nitrógeno al medio para desplazar el oxígeno. La calibración a 0% se realizó una vez que la lectura de la TOD descendiera y se mantuviera estable. Este procedimiento se realizó 3 veces previo al inicio del cultivo.

## **5.6.2. Equipos para asegurar condiciones de esterilidad**

- a) Autoclave marca JP Selecta, modelo Presoclave II 80. Se empleó para esterilizar medios de cultivo y el material necesario gracias al efecto del vapor de agua a una presión de 1.2 bares y una temperatura de 121 °C durante 15 minutos. Este equipo puede operar en un rango de temperaturas comprendido entre 80 y 134 °C y 0.62 a 2 bares de presión. Tiene una capacidad de 80 L.
- 
- b) Cabina de flujo laminar marca TELSTAR, modelo Mini-V/PCR. Cámara de flujo vertical cuya velocidad de impulsión de aire máxima es de 0,45 m s<sup>-1</sup>. Consta además de un filtro de aspiración, un filtro absoluto HEPA y una lámpara de luz ultravioleta. Este equipo permite la manipulación del microorganismo sin riesgo de contaminación, pues el aire inyectado a través del impulsor evita la presencia de partículas en suspensión y actúa como barrera contra microorganismos del exterior de la cabina.

## **5.6.3. Equipos para la conservación y cultivo celular**

- a) Ultrafreezer para la conservación de los microorganismos, se empleó un ultracongelador Sanyo modelo VIP serie MDF U33V, cuyo rango de temperaturas comprende los -50 y -86 °C.

- b) Estufa marca Selecta, modelo S-202, empleada para la incubación de los microorganismos en placa Petri.
- c) Estufa marca Lab-tech modelo Memmert, empleada para la incubación en placa petri. Rango de temperatura hasta +300 °C.
- d) Incubadora orbital marca Sartorius, modelo Certomat® 1S. Equipo con calefacción por circulación de aire y movimiento orbital de 25 mm de diámetro, utilizado para las incubaciones. Es capaz de operar hasta una temperatura máxima de 60 °C y un rango de agitaciones de 40-400 rpm.
- e) Incubadora orbital marca Lab-tech modelo LSI-3016R refrigerada con agitación, utilizada para incubar matraces de cultivo. Posee control digital PID, temperatura de 10 a 60°C, precisión  $\pm 0.1$  a 25°C. agitación de 0 a 300 rpm, reloj de 99 h 59 min.

#### **5.6.4. Equipos de análisis**

- a) Cromatógrafo de líquidos de alta resolución para calcular el grado de acetilación, las muestras se determinaron mediante un cromatógrafo de líquidos Agilent, modelo Series 1100, controlado con el software Agilent ChemStation®. El equipo consta de: una cabina de disolvente, con botellas que contienen los distintos eluyentes; un desgasificador de vacío para la eliminación de burbujas de la fase móvil; una bomba cuaternaria que impulse un determinado caudal del eluyente; un inyector automático capaz de succionar un volumen de muestra programado e introducirlo en una válvula de seis vías para su mezcla con la fase móvil; el horno de columna termostatzado para control de la temperatura en la columna de separación de los componentes de la muestra; un detector de diodos con una lámpara de deuterio y una matriz de fotodiodos, para la obtención de un espectro de absorción UV-Vis (Ultravioleta-Visible); y un detector de índice de refracción con una celda de muestra y otra de referencia.
- b) Espectrofotómetro de absorción UV-Vis marca JASCO, modelo V-630. El sistema óptico constaba de un monocromador simple, con un intervalo de longitud de onda de 190-1100 nm y un ancho de banda espectral de 1.5 nm. Como detector usaba un fotodiodo de silicio (S1337). Para las medidas en la región UV se emplea una lámpara

de deuterio, de 190-350 nm, mientras para la región visible e infrarrojo próximo se utiliza una lámpara halógena de tungsteno, de 330-1100 nm.

### 5.6.5. Equipos auxiliares

- a) Balanza analítica marca Radwag modelo AS 220/C2 rango dual equilibrio con un tiempo de Estabilización de 3 segundos, una capacidad de 4500 g y legibilidad de 1 mg.
- b) Balanza analítica marca Radwag modelo PS 4500/C2 rango dual equilibrio con un tiempo de Estabilización de 3 segundos, una capacidad de 220 g y legibilidad de 0,1 mg.
- c) Balanza de precisión de Sartorius, modelo modelo Practum 1102-1S (capacidad máxima de 1100 g y precisión de  $\pm 0,01$  g)
- d) Balanza analítica de MS204S de Mettler Toledo (capacidad máxima 220 g y precisión de  $\pm 0,0001$  g).
- e) Viscosímetro equipo de tipo caída de bola de Anton Paar, modelo AMNv, con un rango de medida de  $0,3-1000 \pm 0,001$  m Pa\*s.
- f) Centrífuga marca Hettich modelo La UNIVERSAL 320 es una centrifuga universal compacta refrigerada. La temperatura puede ajustarse entre  $-20$  °C hasta  $+40$  °C. Posee una velocidad máxima de 9000 rpm para tubos de 50 mL, o 16000 rpm para tubos de Eppendorf de 1,5 mL.
- g) Centrífuga marca SIGMA, modelo 4-16K, utilizado tanto en la separación celular del caldo de cultivo. Permite controlar la temperatura entre  $-20$  y  $70$  °C y consta de un rotor con una velocidad máxima de 9000 rpm para tubos de 250 mL o un rotor capaz de alcanzar 15000 rpm para tubos de Eppendorf de 1,5 mL.
- h) Microcentrífuga marca IKA®, modelo mini G, con capacidad para 8 microtubos de hasta 2 mL. Empleada para la separación de sobrenadante y pellet. Trabaja a una velocidad fija de 6000 rpm.

-

- i) Estufa de secado marca Selecta, modelo S-202, capaz de controlar la temperatura entre  $40-200 \pm 0,5$  °C.
- j) Estufa marca Lab-tech modelo Memmert, empleada para la realización del método de peso seco. Rango de temperatura hasta +300 °C.
- k) Termo agitador marca Eppendorf, modelo ThermoMixer® C se utilizó para la incubación de muestras para medir ácido crotónico. Este equipo tiene la capacidad de enfriar las preparaciones 15°C por debajo de la temperatura ambiente y hasta 100°C, usando una agitación orbital de 300-3000 rpm.
- l) Medidor de pH marca CRISON, modelo Basic 20. Este equipo es capaz de medir valores comprendidos entre 2 y 16 unidades de pH con un error de  $\pm 0,01$ . La calibración se realizó siempre con 3 puntos, a valores de pH 4,01, 7,01 y 9,21.
- m) Sistema de purificación de agua marca Younglin, aquaMAX™-Ultra 370, con una resistividad de 18. M $\Omega$ ·cm, concentración de carbono orgánico total (Total Organic Carbon-TOC) de 5~10 ppb y un caudal máximo de 1,5 L min<sup>-1</sup>.
- n) Microscopio óptico marca Zeiss, modelo Axioplan 2.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIONES PRIMER OBJETIVO

### 6.1. Producción de alginato a diferentes velocidades de agitación

Se realizaron cultivos por lotes de *A. vinelandii* a tres velocidades de agitación (300, 500 y 700 rpm). La Tabla 6.1 muestra  $\mu$ , la concentración máxima de biomasa,  $Y_{x/s}$ , la concentración máxima de alginato y  $PMP_{m\acute{a}x}$  de alginato.

**Tabla 6.1** Crecimiento celular y producción de alginato en cultivos por lotes de *A. vinelandii* realizados a diferentes velocidades de agitación

Velocidad de agitación (rpm)	Biomasa <sub>máx</sub> (g L <sup>-1</sup> )	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	$Y_{x/s}$ (g g <sup>-1</sup> )	Alginato <sub>máx</sub> (g L <sup>-1</sup> )	$PMP_{m\acute{a}x}$ alginato (kDa)
300	2,9 ± 0,1	0,15 ± 0,01	0,16 ± 0,02	2,9 ± 0,1	357 ± 24
500	4,7 ± 0,1**	0,2 ± 0,01**	0,20 ± 0,01	3,7 ± 0,2	588 ± 31**
700	3,6 ± 0,1	0,1 ± 0,02	0,15 ± 0,02**	5,5 ± 0,2**	175 ± 46

Los valores corresponden a promedios de tres réplicas independientes ± desviación estándar. Las diferencias entre condiciones fueron evaluadas mediante análisis de varianza unidireccional (ANOVA). Se consideraron estadísticamente significativas según el siguiente criterio: \* P < 0,05 (significativo), \*\* P < 0,01 (muy significativo), \*\*\* P < 0,001 (altamente significativo).

La concentración máxima de biomasa se obtuvo a 500 rpm, con un valor de 4,7 ± 0,1 g L<sup>-1</sup>, mientras que la concentración más baja se obtuvo a 300 rpm (2,9 ± 0,1 g L<sup>-1</sup>). Por otro lado,  $\mu$  fue mayor a 500 rpm (0,2 ± 0,01 h<sup>-1</sup>) y el valor más bajo se observó a 700 rpm (0,14 ± 0,02 h<sup>-1</sup>). El  $Y_{x/s}$  fue mayor a 500 rpm, con un valor de 0,2 ± 0,01 g g<sup>-1</sup>, mientras que a 300 y 700 rpm disminuyó considerablemente en comparación con 500 rpm. A 700 rpm se obtuvo una mayor concentración de alginato (5,5 ± 0,2 g L<sup>-1</sup>) en relación con las otras velocidades de agitación.

Díaz-Barrera et al., (2021) y Ponce et al., (2021) utilizaron la misma bacteria para producir alginato en cultivos a 300, 500 y 700 rpm en condiciones de TOD no controladas y

en condiciones diazotróficas. Estos autores encontraron que a 700 rpm se produjo una mayor cantidad de alginato entre 3,3 a 4,17 g L<sup>-1</sup>, lo que indica que, al aumentar la velocidad de agitación, la mayor parte del alginato se sintetizó en la fase estacionaria, mientras que a 300 y 500 rpm se sintetizó en la fase de crecimiento del cultivo. Medina et al., (2023) evaluaron la producción de alginato a tres velocidades de agitación (200, 370 y 500 rpm) en cultivos con *A. vinelandii* AT9 (presenta inactivación del gen mucG), determinando que un aumento en la agitación y, por consiguiente, en la VTO, promovía el crecimiento celular y la producción de alginato.

Al analizar el PMP<sub>máx</sub> del alginato sintetizado (Tabla 6.1), a 500 rpm se alcanza el mayor valor (588 ± 31 kDa), mientras que a 700 rpm el valor es casi 3,4 veces menor. Diversos artículos han reportado que las propiedades del alginato dependen del peso molecular, el grado de acetilación y el contenido de G/M (Castillo et al., 2013; Remminghorst y Rehm, 2006; Augst et al., 2006).

Díaz-Barrera et al., (2021) reportó el efecto de velocidad de agitación sobre el PMP y la razón G/M del alginato en cultivos por lotes de *A. vinelandii* a diferentes escalas (3 y 30 L), Sus resultados demostraron que, un aumento en la velocidad de agitación incrementó  $\mu$  y la VTO, sin evidenciar daño celular. Determinaron que un incremento de la  $qO_2$  promovió un aumento en el PMP y en la razón G/M del alginato, mientras que valores superiores hubo una disminución de ambos parámetros muy similar a nuestros resultados. Estos hallazgos sugieren que el  $qO_2$  influye directamente en la calidad del alginato posiblemente a través de mecanismos relacionados con el metabolismo respiratorio, la disponibilidad de precursores como el GDP-manurónico y/o la regulación de las rutas de biosíntesis y modificación del polímero.

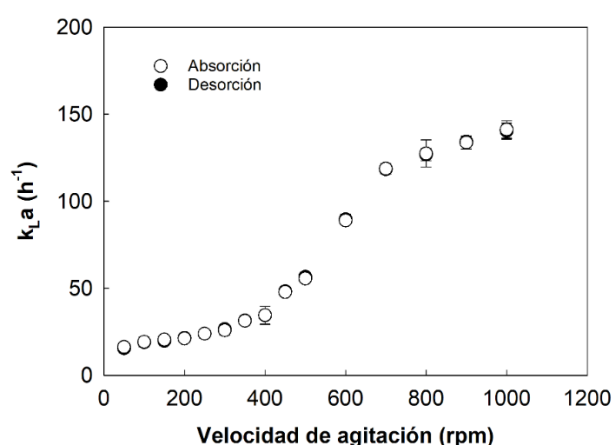
Si bien se ha demostrado que la  $qO_2$  puede modular la calidad del alginato, aún no se comprende completamente cómo las condiciones hidrodinámicas generadas por variaciones en la velocidad de agitación influyen directamente sobre la VCO y el  $qO_2$ . Dado que estos parámetros están relacionados el metabolismo respiratorio, comprender esta relación es clave para optimizar la producción de alginato con propiedades controladas. Por tanto, es necesario estudiar el efecto de las condiciones hidrodinámica sobre la VCO y el  $qO_2$ , que podrían explicar la relación entre la velocidad de agitación y la calidad del alginato.

## 6.2. Determinación de la VTO y VCO a diferentes condiciones de hidrodinámica a través del cambio en la velocidad de agitación

La caracterización hidrodinámica es un paso fundamental para optimizar cualquier bioproceso, ya que las condiciones de mezclado y la VTO son críticas para el crecimiento y metabolismo celular. En este contexto, la hidrodinámica se define como el estudio del movimiento y la interacción de las fases líquida y gaseosa dentro del biorreactor bajo la influencia de la velocidad de agitación y/o aireación. Un parámetro clave para evaluar este fenómeno es el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ( $k_La$ ) (Olmos et al., 2013; Zhan et al., 2019).

Se realizó la determinación experimental del  $k_La$ . Para ello, se empleó el método dinámico sin células, descrito originalmente por Bandyopadhyay et al., (1967) y detallado ampliamente en la Sección 5.4 de materiales y métodos. Para llevar a cabo esta técnica, se midió la distribución geométrica del biorreactor, la cual se detalla en el capítulo de materiales y métodos (Tabla 5.3). Posteriormente, se midió el valor de  $k_La$  utilizando el método dinámico sin células. Para ello, se empleó el medio de cultivo propuesto en proporciones específicas (Tabla 5.1), lo que permitió obtener curvas de desorción y absorción.

Se seleccionaron trece velocidades de agitación, que variaron desde 50 a 1000 rpm, y cada experimento se realizó por cuadruplicado para asegurar una buena reproducibilidad ajuste robusto y antes de aplicar este método se calibró cada condición por cuadruplicado, Además, se estimó el tiempo de respuesta del electrodo (Sección 5.4.2). Cabe destacar que, bajo las condiciones estudiadas, fue necesario aplicar una corrección en la respuesta del electrodo para las velocidades de agitación de 800, 900 y 1000 rpm.



**Figura 6.1** Curvas de desorción y absorción para la determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ( $k_La$ ) mediante el método dinámico sin células.

En la Figura 6.1 se muestran los valores de  $k_L a$  obtenidos a las diferentes velocidades de agitación estudiadas. Se sabe que los cambios en la velocidad de agitación afectan las condiciones de mezcla y transferencia de oxígeno (García-Ochoa et al., 2010a).

Se puede observar que el  $k_L a$  aumenta de forma lineal conforme se incrementa la velocidad de agitación a partir de 400 rpm. A 50 rpm se obtiene un  $k_L a$  de  $16,2 \pm 2,0 \text{ h}^{-1}$  el cual aumenta hasta  $141,2 \pm 5,0 \text{ h}^{-1}$  cuando la velocidad de agitación es de 1000 rpm. Además, cabe destacar que, tanto la absorción como la desorción poseen valores similares lo que indica que hay consistencia en el análisis realizado.

Respecto de estos resultados, Scargiali et al., (2010) estudiaron diferentes métodos para medir el  $k_L a$  en biorreactores de tanque agitado aireados. Ellos comprobaron que uno de los puntos clave para obtener valores confiables de  $k_L a$  es asegurar una mezcla perfecta entre las fases líquida y gaseosa, lo que resulta en valores similares en las curvas de desorción y absorción; este hallazgo se correlaciona con nuestros resultados. Además, la Figura 6.1 muestra que la relación entre el  $k_L a$  y la velocidad de agitación puede dividirse en tres regiones distintivas. Entre 50 y 400 rpm, el  $k_L a$  exhibe un aumento gradual, pero más pausado. Esto sugiere que, a bajas velocidades de agitación, no afecta de la misma manera en la magnitud el  $k_L a$ . A partir de las 400 rpm, se observa un incremento más pronunciado y lineal del  $k_L a$  a medida que la velocidad de agitación aumenta, indicando una mejor transferencia de oxígeno, probablemente debido a una mejor dispersión de las burbujas de aire y un mayor contacto gas-líquido (Pinelli, 2007).

Finalmente, por sobre 700 rpm, el aumento en el  $k_L a$  tiende a estabilizarse y una tendencia a un valor más constante o de saturación cuando está incluida la corrección del tiempo de respuesta del electrodo. Esto podría indicar que se ha alcanzado la máxima capacidad de transferencia de oxígeno del sistema y que a altas velocidades de agitación el  $k_L a$  se ve afectado por el tiempo de respuesta del electrodo de oxígeno (Cerri et al., 2016). Scargiali et al., (2010) analizaron la influencia del tiempo de respuesta del electrodo del oxígeno y encontraron que, a mayores tiempos de respuesta, el valor del  $k_L a$  estaba influenciado por la precisión del sensor de oxígeno, corroborando nuestros resultados.

En un estudio similar, Patel & Thibault, (2009) analizaron diferentes métodos para medir el  $k_L a$  utilizando un biorreactor de tanque agitado de 22 L. Observaron que, a bajas velocidades de agitación no hay un efecto en la magnitud del  $k_L a$  incrementa de forma lineal, lo cual es coincidente con nuestros resultados. Ellos sugieren que la velocidad de agitación

tiene una influencia "no significativa" sobre el  $k_L a$  a bajas velocidades de agitación, en comparación a altas velocidades de agitación.

Finalmente, Damiani et al., (2014) reportaron que otros factores pueden influir en el valor de  $k_L a$ , como la transferencia de masa entre el espacio de cabeza y la fase líquida del biorreactor. Utilizando un biorreactor de tanque agitado de 3 L con bajo flujo de aireación, determinaron que, al modificar la ecuación de desorción para la obtención del  $k_L a$ , obtuvieron una mejor correlación de los datos, sin embargo, de la misma forma observaron que a bajas velocidades de agitación no afecta de la misma forma la magnitud del  $k_L a$ . Es por ello que, además de los factores ya mencionados, la elección del tipo de impulsor y la configuración son fundamentales para garantizar condiciones hidrodinámicas adecuadas que podrían mejorar la correlación del  $k_L a$  a diferentes velocidades de agitación (Chalmers, 2021, 2015; Chalmers & Ma, 2015). Posterior a la determinación de  $k_L a$  se estimó la  $VTO_{m\acute{a}x}$  para cada velocidad de agitación, la cual se muestra en la Tabla 6.2.

**Tabla 6.2** Estimación de la  $VTO_{m\acute{a}x}$  utilizando  $k_L a$  por método dinámico sin células

Velocidad de agitación (rpm)	$VTO_{m\acute{a}x}$ (mmol L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
50	3,8 ± 0,1
100	4,6 ± 0,2
150	4,9 ± 0,3
200	5,2 ± 0,1
250	5,8 ± 0,2
300	6,3 ± 0,1
350	7,6 ± 0,2
400	8,4 ± 0,3
450	12,2 ± 0,4
500	13,6 ± 0,2
600	21,7 ± 0,5
700	28,7 ± 0,9
800	30,1 ± 0,7
900	31,8 ± 1,6
1000	33,3 ± 0,1

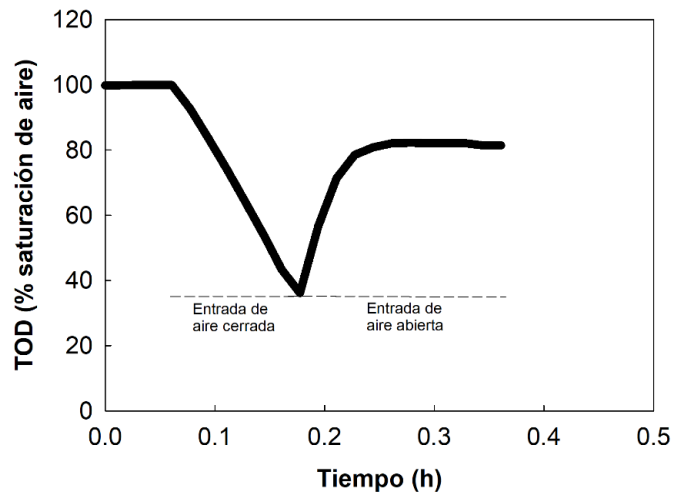
En la Tabla 6.2 se muestran los diferentes valores de  $VTO_{m\acute{a}x}$ , obtenidos por medio de la Ecuación 5.1, que considera el valor del  $k_L a$  obtenido en la figura 6.1, la concentración de oxígeno disuelto en equilibrio ( $C^* = 0,2375$  mmol L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) que depende de las condiciones de cultivo (Weiss, 1970) y la concentración de oxígeno disuelto en el cultivo en condiciones de limitación de oxígeno ( $C_L = 0$  mmol L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) (Padilla-Córdova et al., 2020) Estos valores se

encuentran entre  $3,8 \pm 0,1$  y  $33,3 \pm 0,1$  mmol L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> y son similares a los reportados previamente calculando el balance de gases de salida del biorreactor y utilizando la Ecuación 5.1 (Díaz-Barrera et al., 2021; Ponce et al., 2021; Padilla-Córdova et al., 2020; Díaz-Barrera et al., 2014).

En cultivos aeróbicos, el oxígeno disuelto cumple un rol fundamental como aceptor final de electrones en la cadena respiratoria (García-Ochoa et al., 2020; García et al., 2020; Pirt, 1957). En este contexto, el  $k_L a$  y la VTO permiten evaluar la capacidad del sistema para transferir oxígeno desde la fase gaseosa al medio líquido, mientras que la VCO determina la demanda metabólica del cultivo.

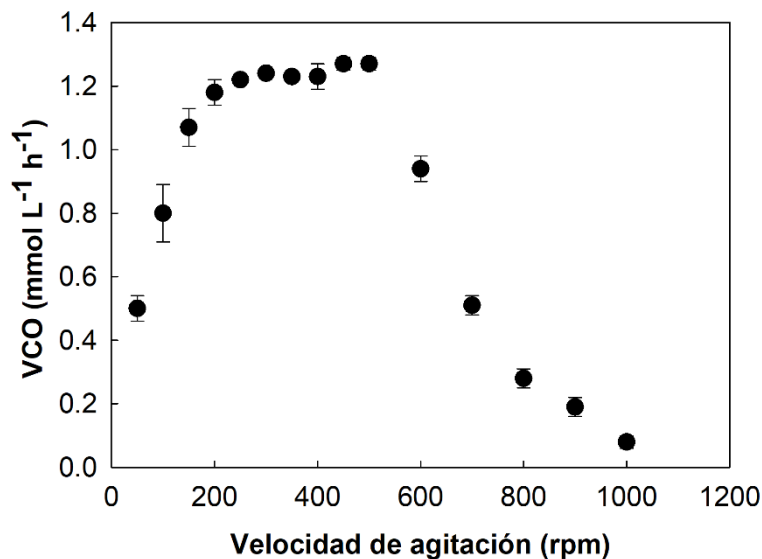
Diversos estudios (García-Ochoa et al., 2011, 2013, 2015, 2020) han demostrado que la actividad respiratoria (VCO y  $qO_2$ ) de las células puede verse significativamente afectada por el estrés generado por fuerzas de cizallamiento. Este fenómeno, inducido por condiciones hidrodinámicas como altas velocidades de agitación o incremento en el flujo de aire, puede alterar la fisiología celular y, en consecuencia, su demanda de oxígeno. Una manera de evaluar cómo estas condiciones influyen sobre un microorganismo específico es mediante el análisis de la velocidad de consumo de oxígeno (VCO) bajo diferentes condiciones de transferencia de oxígeno.

Para establecer el rango de condiciones hidrodinámicas a evaluar, se estudió la VCO inicial y su dependencia respecto a la velocidad de agitación. Este análisis se basó en lo reportado por García-Ochoa et al. (2000), quienes describen el efecto teórico de las condiciones de transferencia de oxígeno (variaciones en la velocidad del agitador o en el flujo de gas) sobre la VCO en un bioproceso. En este contexto, la VCO inicial se determinó experimentalmente a las diferentes velocidades de agitación seleccionadas mediante el método dinámico con células, con el fin de establecer los parámetros relevantes para su posterior análisis (Sección 5.4.5). Para ello, se implementó dicho método en cultivos por lotes de *A. vinelandii*. La Figura 6.2 muestra la evolución de TOD durante la aplicación del método dinámico con células inoculadas en un biorreactor operando a 500 rpm, 1 vvm y 30 °C.



**Figura 6.2** Resultado de aplicación del método dinámico con células para la determinación de la VCO en cultivos de *A. vinelandii* en biorreactor de 3 L a 500 rpm, 30°C y 1 vvm.

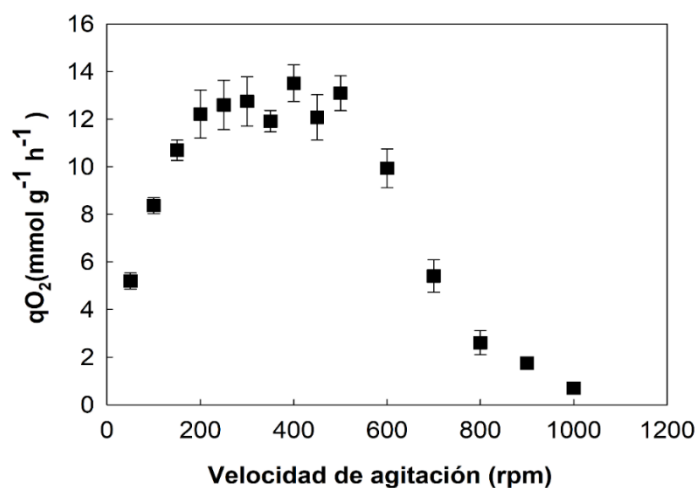
Este método experimental permitió determinar la VCO y el  $k_L a$ . En la Figura 6.2, se muestra que el sistema tiene un valor de TOD de 100 % saturación de aire y se procede a inocular bacterias que se encuentran en fase de crecimiento y se corta el suministro de aire. De esta manera, la VCO se obtiene a través de la pendiente de la gráfica de la concentración de oxígeno disuelto (después de cerrar el flujo de aire) en función del tiempo. Al restablecer el suministro de aire, la TOD aumentó hasta estabilizarse en un valor constante, permitiendo así la estimación del  $k_L a$ . El valor del  $k_L a$  estimado mediante este método fue similar al obtenido previamente por el método de desgasado, lo que valida la consistencia de las determinaciones realizadas. Para todas las condiciones la concentración de biomasa fue de  $0,1 \pm 0,02 \text{ g L}^{-1}$ . A continuación, la Figura 6.3 muestra el efecto de la velocidad de agitación sobre la VCO en cultivos por lotes de *A. vinelandii* en cultivos recientemente inoculados.



**Figura 6.3** Efecto de la velocidad de agitación sobre la VCO

Cabe destacar que esta es la primera vez que se determina una curva experimental de la VCO en relación con la velocidad de agitación utilizando células recién inoculadas en fase de crecimiento. Entre 50 y 2000 rpm, se obtuvo un valor de VCO que fue incrementando de  $0,50 \pm 0,04$  hasta  $1,2 \pm 0,04$   $\text{mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$ . Para velocidades de agitación entre 200 y 500 rpm, el valor de la VCO fue similar, en un rango entre  $1,2 \pm 0,04$  y  $1,3 \pm 0,02$   $\text{mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$ . Un aumento en la velocidad de agitación por sobre 500 rpm disminuyó significativamente la VCO. A medida que la velocidad de agitación aumentó de 600 a 1000 rpm, el valor de la VCO disminuyó de  $0,9 \pm 0,04$  a  $0,01 \pm 0,02$   $\text{mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$ .

Al comparar la curva obtenida con la curva teórica de VCO propuesta por García-Ochoa et al., (2009) (Figura 1.15), se observa una correlación con el comportamiento descrito en el caso (a). Es decir, a bajas velocidades de agitación, la VCO es menor, debido a una limitada difusión del oxígeno disuelto hacia las células. A medida que aumenta la velocidad de agitación, mejora el mezclado y la transferencia de oxígeno, lo que permite a las células consumir oxígeno de forma más eficiente, incrementando así la VCO. Luego, al aumentar la velocidad de agitación, se alcanza la meseta del sistema biológico y la VCO se mantiene constante (consistente con los valores obtenidos entre 200 y 500 rpm). Finalmente, a velocidades de agitación más altas (600 - 1000 rpm), la hidrodinámica del sistema podría influir en la VCO y esto podría hacer que la célula se vea afectada por el aumento de la turbulencia del sistema en el que está presente (García-Ochoa et al., 2020; García-Ochoa & Gómez, 2009). A continuación, en la Figura 6.4. se muestra efecto de la velocidad de agitación sobre la  $qO_2$  estimada a partir de los valores de VCO calculados al aplicar el método dinámico con células (Figura 6.4) y utilizando la Ecuación 5.13.



#### Figura 6.4 Efecto de la velocidad de agitación sobre la $qO_2$ .

En la Figura 6.4 se muestra que entre 50 y 200 rpm la  $qO_2$  aumentó desde  $5,2 \pm 0,3$  a  $12,2 \pm 1,0 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Luego entre 200 y 500 rpm se obtiene un valor de  $qO_2$  entre  $11,9 \pm 0,5$  y  $12,8 \pm 1,0 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Finalmente, de 600 a 1000 rpm el valor de la  $qO_2$  disminuye de  $9,9 \pm 0,8$  a  $0,7 \pm 0,2 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , indicando que al aumentar la velocidad de agitación el valor de si tiene un efecto en la  $qO_2$ . Estos resultados fueron comparados con algunos valores máximos de  $qO_2$  reportados por Díaz-Barrera et al., (2014), en cultivos por lotes de *A. vinelandii* a una velocidad de agitación de 200 y 600 rpm en biorreactores de 3 L y 14 L, donde obtuvieron valores de  $qO_{2\text{máx}}$  de 10,6 y 8,3  $\text{mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  respectivamente, indicando que la metodología utilizada es confiable.

La disminución observada en la VCO y la  $qO_2$  en *A. vinelandii* a velocidades de agitación superiores a 500 rpm sugiere un efecto asociado a la hidrodinámica del sistema, específicamente al cizallamiento. Este tipo de efecto podría alterar la integridad de la membrana celular, la respiración celular y la producción de alginato y PHB. Tal como se plantea en García-Ochoa et al., (2015), la  $qO_2$  actúa como un indicador sensible del entorno hidrodinámico, y la disminución de su valor refleja una respuesta fisiológica ante condiciones desfavorables dentro del biorreactor. En este contexto, la disminución de  $qO_2$  observada en este estudio puede interpretarse como un signo temprano de daño o adaptación celular frente a niveles excesivos de agitación.

Para evaluar si distintas condiciones hidrodinámicas tienen un efecto sobre los cultivos de *A. vinelandii*, es necesario determinar experimentalmente la VCO y la  $qO_2$  en diferentes etapas del cultivo. Sin embargo, como se ha reportado previamente, durante el período de crecimiento activo en cultivos por lotes de *A. vinelandii*, los niveles de oxígeno disuelto suelen mantenerse cercanos a cero (Díaz-Barrera et al., 2021; Ponce et al., 2021; Díaz-Barrera et al., 2014; Díaz-Barrera et al., 2007). Bajo estas condiciones (TOD cercana a cero), resulta imposible estimar la VCO de forma directa, ya que no existe un gradiente de oxígeno medible en el sistema. Por esta razón, en este trabajo se implementó el método dinámico con células modificado, descrito por Gómez et al., (2006), que permite determinar la VCO en condiciones controladas y reproducibles en el cultivo.

### 6.3. Influencia de las condiciones hidrodinámicas en la velocidad de consumo de oxígeno

Se ha reportado que existe un efecto de la hidrodinámica sobre la célula causado por el burbujeo, la formación de las burbujas y la utilización de agentes antiespumantes (García-Ochoa et al., 2020; Curran & Black, 2004; Barbosa et al., 2003; Chisti, 2001). Para identificar este efecto, han sido estimados los parámetros característicos de la mezcla turbulenta para diferentes condiciones de agitación. Los valores calculados se muestran en la Tabla 6.3.

**Tabla 6.3** Estimación de la potencia gaseada ( $P_g$ ), energía promedio ( $\epsilon_{promedio}$ ), microescala de turbulencia de Kolmogorov ( $\lambda_s$ ), velocidad de la punta de impulsor ( $v_{punta}$ ), velocidad de corte ( $\gamma_{promedio}$ ,  $\gamma_{máxima}$ ) y esfuerzo cortante ( $\tau_t$ )

Velocidad de agitación (rpm)	$P_g$ (W)	$\epsilon_{promedio}$ (W Kg <sup>-1</sup> )	$\lambda_s * 10^{-4}$ (m)	$v_{punta}$ (m s <sup>-1</sup> )	$\gamma_{promedio}$ (s <sup>-1</sup> )	$\gamma_{máxima}$ (s <sup>-1</sup> )	$\tau_t$ (N m <sup>-2</sup> )
50	0,001	0,0005	12,1	0,1	8	36	0,1
100	0,01	0,004	7,1	0,2	22	101	0,2
150	0,02	0,01	5,3	0,4	41	185	0,4
200	0,1	0,03	4,2	0,5	62	285	0,6
250	0,1	0,1	3,6	0,6	87	399	0,9
300	0,2	0,1	3,1	0,7	114	525	1,2
350	0,3	0,2	2,8	0,8	144	661	1,4
400	0,4	0,3	2,5	0,9	176	808	1,8
450	0,6	0,4	2,3	1,1	210	964	2,1
500	0,8	0,5	2,1	1,2	246	1130	2,5
600	1,3	0,9	1,8	1,4	324	1485	3,2
700	2,1	1,4	1,6	1,7	408	1871	4
800	3,1	2,1	1,5	1,9	499	2286	5
900	4,4	3,0	1,2	2,1	595	2728	6
1000	6,1	4,1	1,1	2,4	697	3195	7

Como se muestra en la Tabla 6.3, de acuerdo con la geometría del biorreactor se determinaron algunos parámetros hidrodinámicos. Se utilizó una densidad cercana al agua de 1000 kg m<sup>-3</sup>. Se determinó la potencia gaseada ( $P_g$ ) la cual aumentó de 0,001 a 6,1 (W) entre 50 y 1000 rpm, esto indicaría que si el valor es alto puede haber efectos por cizalla en el sistema.

Se calculó la  $\varepsilon_{promedio}$ , se puede observar que hay 3 zonas en esta tabla de 50 a 200 rpm donde el  $\varepsilon_{promedio}$  aumenta de 0,0005 a 0,03 W Kg<sup>-1</sup>, luego de 250 a 500 rpm tiene un incremento de 0,1 a 0,5 W Kg<sup>-1</sup>, y finalmente una zona de 600 a 1000 donde aumenta de forma lineal de 0,9 a 4,1 W Kg<sup>-1</sup>. Esta información indica que, una mayor  $\varepsilon_{promedio}$  mejora la dispersión de las burbujas de aire, aumenta la solubilidad del oxígeno, evitando zonas con sedimentación e influye en el crecimiento celular por la distribución de los nutrientes a la célula (Murrieta-Dueñas et al., 2022; Gelves, 2020).

Se determinó la microescala de turbulencia de Kolmogorov ( $\lambda_s$ ) con el tamaño promedio de las células de *A. vinelandii*, que presentan una morfología bacilar con diámetro cercano 2  $\mu\text{m}$  (Sabra et al., 2000). Los resultados muestran que, aunque los vórtices generados en el sistema son mayores que las células en todo el rango evaluado (50–1000 rpm), a altas velocidades de agitación los tamaños de los vórtices se aproximan al tamaño celular. Esta cercanía sugiere que, si bien no se alcanza un nivel de cizalla suficiente para producir ruptura celular directa, sí podría generar algún efectos fisiológico. Lo anterior permite explicar la disminución observada en la  $qO_2$  y la VCO a velocidades superiores a 500 rpm, en línea con lo reportado por García-Ochoa et al., (2015), donde la hidrodinámica del sistema actúa como modulador del metabolismo celular.

Se determinó la velocidad de punta del agitador ( $v_{punta}$ ), este valor crece linealmente con la velocidad de agitación llegando a valores de 2,4 m s<sup>-2</sup>. Este es un indicador directo de las fuerzas de cizallamiento más intensas que experimentan las células al pasar cerca del agitador cuando la velocidad de agitación aumenta por sobre 500 rpm.

La velocidad de corte promedio ( $\gamma_{promedio}$ ) y máxima ( $\gamma_{máxima}$ ), aumentan con la velocidad de agitación, siendo la  $\gamma_{máxima}$  relevante al representar los puntos de mayor estrés mecánico para las células. En este estudio, a 1000 rpm, la velocidad de corte máxima supera los 3000 s<sup>-1</sup>, un valor alto en comparación con rangos reportados en la literatura, donde velocidades de corte superiores a 1000 - 2000 s<sup>-1</sup> pueden inducir daños celulares en bacterias sensibles (García-Ochoa & Gomez, 2009). Sin embargo, bacterias como *A. vinelandii*, pueden tolerar estas condiciones hasta cierto punto, aunque se debe considerar que zonas localizadas de alta cizalla pueden afectar la viabilidad y productividad (Chisti, 2001).

El esfuerzo cortante turbulento ( $\tau_t$ ) aumentó proporcionalmente con la velocidad de agitación, reflejando un incremento de las fuerzas de cizalla en el medio. Diversos estudios han demostrado que bacterias Gram negativas, como *A. vinelandii*, presentan una alta

tolerancia al esfuerzo cortante, soportando niveles de hasta 10 N/m<sup>2</sup> sin pérdida significativa de viabilidad (Chisti, 2001; Garcia-Ochoa & Gómez, 2009). Además, este tipo de tensión puede inducir una mayor producción de exopolisacáridos como mecanismo de protección (Bandaipheth & Prasertsan, 2006). Estos parámetros, han sido previamente determinados como parámetros característicos de la mezcla turbulenta. Por ejemplo, estudios previos han evaluado estos parámetros en cultivos de *R. erythropolis* IGTS8 (García-Ochoa et al., 2015; Gómez et al., 2015). Ellos observaron que a bajas velocidades de agitación (entre 150 y 350 rpm, se generó una baja velocidad de corte de 152 a 543 s<sup>-1</sup>), y la qO<sub>2</sub> no mostró variaciones significativas, sugiriendo un impacto hidrodinámico mínimo lo cual se correlaciona con nuestros datos entre 200 y 500 rpm (Tabla 6.3 y Figura 6.4). Sin embargo, al aumentar las velocidades de agitación (entre 450 y 650 rpm), las condiciones hidrodinámicas del cultivo comenzaron a afectar a las células.

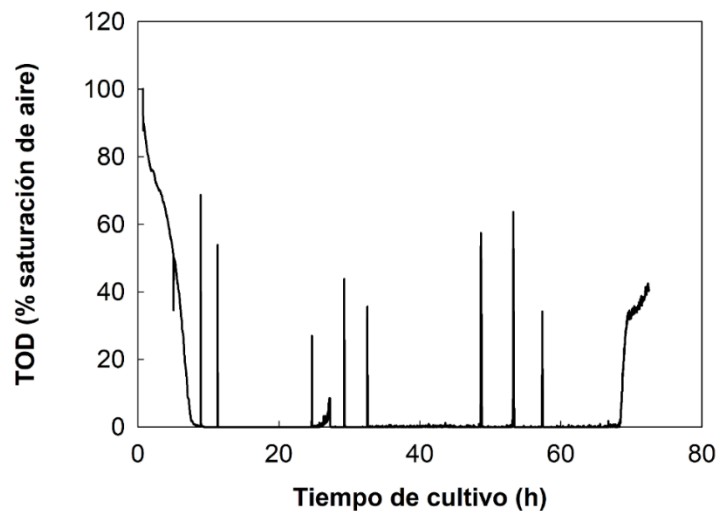
A pesar de que parámetros turbulentos  $\lambda_s$  sugieren una baja probabilidad de daño físico directo a la célula completa (lisis), y que las fuerzas hidrodinámicas no afectarían directamente a *A. vinelandii*, es fundamental realizar un estudio más detallado para confirmar esta hipótesis. Esto se debe a los altos valores de  $\gamma_{m\acute{a}xima}$  y al  $\tau_t$  que sí podrían estar generando un efecto por cizallamiento suficiente para inducir una respuesta metabólica en *A. vinelandii*. Es esencial considerar el comportamiento celular junto con su actividad respiratoria, y el impacto de estas condiciones sobre la producción de alginato y PHB bajo diferentes velocidades de agitación. Por ello, se requiere un análisis de estos parámetros para determinar si el cizallamiento induce efectos fisiológicos directos o respuestas metabólicas que no pueden deducirse únicamente del tamaño relativo de la microescala de Kolmogorov.

#### **6.4. Caracterización de la qO<sub>2</sub> a diferentes velocidades de agitación a través de pulsos de oxígeno con el fin de evaluar la respiración en la producción de alginato y PHB en cultivos por lotes de *A. vinelandii* ATCC 9046.**

Con el objetivo de estudiar la respiración de *A. vinelandii* durante la producción de alginato y PHB, se implementó un método experimental para estimar la VCO y la qO<sub>2</sub> a diferentes velocidades de agitación.

##### **6.4.1. Implementación de un método experimental para medir la VCO y qO<sub>2</sub> mediante pulsos de oxígeno en cultivos por lotes de *A. vinelandii*.**

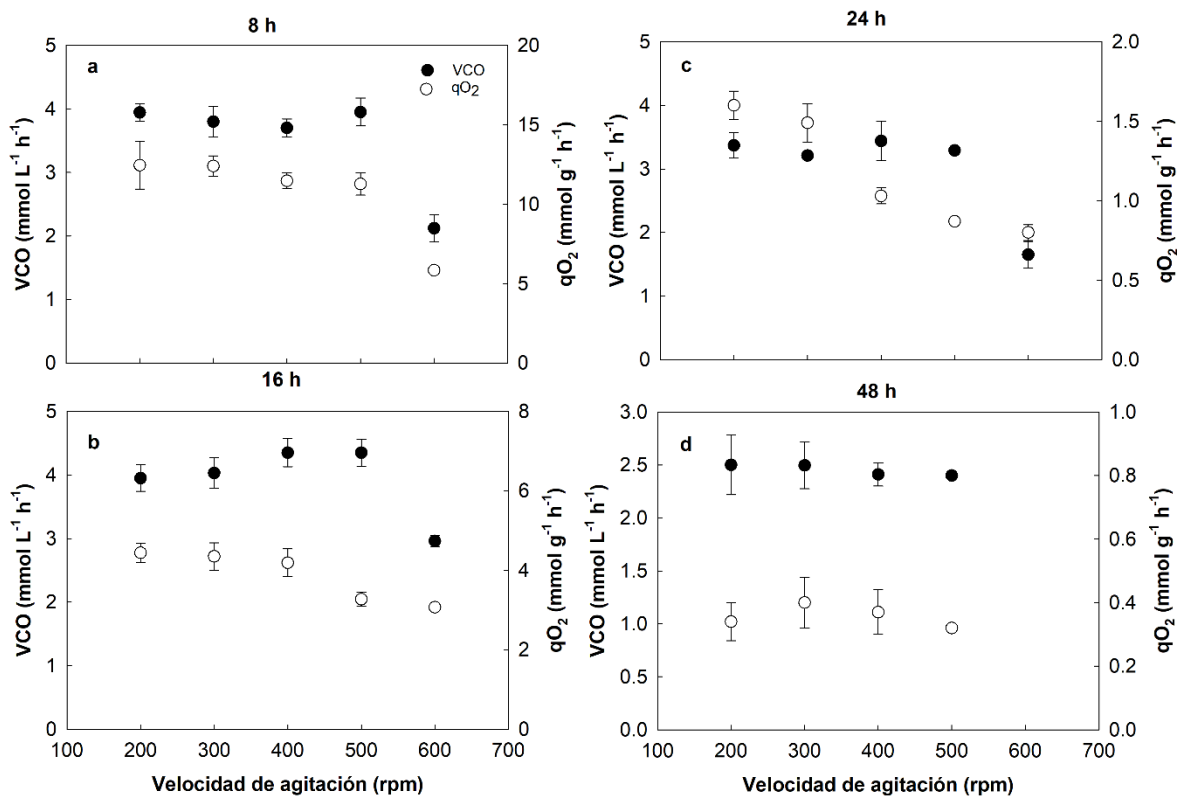
Para determinar la VCO y la  $qO_2$  durante un cultivo por lotes de *A. vinelandii*, se implementaron el método dinámico y una variante modificada, ambos previamente descritos en las Secciones 5.4.5 y 5.4.6. La Figura 6.6 muestra una curva experimental de TOD, en la cual se aplicaron ambos métodos a una velocidad de agitación de 500 rpm.



**Figura 6.5** Perfil de TOD en cultivos con pulsos de oxígeno de *A. vinelandii* cultivados en biorreactor de 3 L a 500 rpm, 30°C y 1 vvm.

Como se muestra en la Figura 6.5, durante el tiempo inicial de cultivo (0 a 10 h) fue posible aplicar el método dinámico (sin pulsos de oxígeno) ya que la TOD era mayor al 10%. Posteriormente, entre las 10 y las 65 h, la TOD del cultivo disminuyó por debajo del 10%. Para cuantificar la VCO en estas condiciones, se aplicó el método dinámico modificado (con pulsos de oxígeno), el cual implica cortar el suministro de aire e inyectar oxígeno puro durante 10 segundos, asegurando que la concentración de oxígeno no supere el 20%. Finalmente, entre las 65 y las 72 h no fue aplicado método dinámico modificado y/o tradicional debido a que, el cultivo se encontraba en fase estacionaria dado el aumento de la TOD desde 0,1 hasta 42% de TOD.

Se realizaron mediciones de VCO y  $qO_2$  a diferentes tiempos de cultivo (8, 16, 24 y 48 h) en cultivos por lotes de *A. vinelandii* y a diferentes velocidades de agitación, aplicando el método dinámico y su variante modificada. La Figura 6.6 muestra la evolución de estos parámetros bajo pulsos de oxígeno, una estrategia utilizada para manejar cultivos con limitación de oxígeno. La velocidad de agitación, al modificar la hidrodinámica del sistema, afecta la transferencia de oxígeno y la respuesta respiratoria celular, por lo que el análisis de la evolución de VCO y  $qO_2$  puede funcionar como un indicador fisiológico de la célula.



**Figura 6.6** Perfil de VCO y  $qO_2$  a diferentes tiempos de cultivo 8, 16, 24, y 48 h de cultivo en cultivos por lotes de *A. vinelandii* realizados en un biorreactor de 3 L a diferentes velocidades de agitación (200, 300, 400, 500 y 600 rpm) utilizando pulsos de oxígeno.

La Figura 6.6 muestra el efecto de la velocidad de agitación sobre la VCO y  $qO_2$  a diferentes tiempos de cultivo, considerando que concentración de biomasa es similar entre las diferentes condiciones de velocidad de agitación. A las 8 horas de cultivo, se observa que los valores de VCO y  $qO_2$  son similares entre 200 y 500 rpm, con valores de  $3,7 \pm 0,1$  y  $3,95 \pm 0,2$  mmol L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> para la VCO y  $12 \pm 0,2$  y  $12,5 \pm 0,5$  mmol g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> para  $qO_2$ . Esta similitud en la tendencia y en los valores entre ambos parámetros podría indicar que en este tiempo de cultivo no existe un efecto de la hidrodinámica sobre la célula observado a través de la  $qO_2$ . Sin embargo, a 600 rpm, tanto la VCO como la  $qO_2$  muestran una disminución en comparación a las otras velocidades de agitación. Esta disminución en la VCO y  $qO_2$  podría sugerir, incluso en fases iniciales y con baja concentración de biomasa, el incremento en la velocidad de agitación (y consecuentemente, el cizallamiento) comienza a tener un efecto en la capacidad de consumo de oxígeno de las células.

A las 16 h de cultivo se observa que, entre 200 y 500 rpm la VCO se mantiene entre  $4,0 \pm 0,2$  y  $4,4 \pm 0,2$   $\text{mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$  lo que indica un incremento en la capacidad respiratoria general del cultivo. Este comportamiento podría indicar una mejor transferencia de oxígeno a medida que se incrementa la agitación, favoreciendo el metabolismo celular sin evidenciar efectos asociados al estrés hidrodinámico. Sin embargo, al analizar la  $qO_2$ , se observa que los valores son menores que a las 8h de cultivo, y se mantienen similares solo entre 200 y 400 rpm ( $4,2 \pm 0,4$  y  $4,4 \pm 0,2$   $\text{mmol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ ), disminuyendo a 500 y 600 rpm. Esta disminución en la  $qO_2$  a pesar de que la biomasa aumenta, pero es similar entre 400 y 600 rpm una mayor concentración celular, sugiere que el aumento en la velocidad de agitación podría inducir efectos de cizallamiento que afectan la actividad metabólica específica.

A las 24 horas de cultivo, se observa que la VCO entre 200 y 500 rpm es similar, con valores entre  $3,3 \pm 0,1$  y  $3,4 \pm 0,3$   $\text{mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$  mientras que a 600 rpm la VCO disminuye aproximadamente un 50 % respecto al valor máximo. En cuanto  $qO_2$ , los valores más altos se presentan a 200 y 300 rpm, alcanzando  $1,8 \pm 0,1$   $\text{mmol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ , aunque en estas condiciones la biomasa es menor ( $2,6 \text{ g L}^{-1}$ ) en comparación con 400 y 500 rpm ( $3,8 \text{ g L}^{-1}$ ), y vuelve a disminuir a  $2,7 \text{ g L}^{-1}$  a 600 rpm. Aunque la biomasa sea similar a 200, 300 y 600 rpm, pero la  $qO_2$  no es igual, sugiere que hay un factor adicional, distinto de la concentración celular, que está modulando la actividad metabólica específica. Este factor probablemente está relacionado con las condiciones hidrodinámicas del cultivo. A 600 rpm, el estrés mecánico asociado al aumento en la agitación podría afectar la integridad celular o inducir respuestas adaptativas, como la activación del regulador global *algU*, que modula genes relacionados con el estrés y la biosíntesis de alginato. La disminución en la  $qO_2$  bajo estas condiciones podría reflejar un desvío metabólico hacia mecanismos de mantenimiento y protección, más que hacia el crecimiento activo. Estos resultados indican que un aumento en la agitación no siempre mejora la eficiencia metabólica, resaltando la importancia de balancear la transferencia de oxígeno con el estrés hidrodinámico generado.

Finalmente, a las 48 h de cultivo, la actividad respiratoria disminuye debido al aumento de biomasa y/o por agotamiento de sustrato en algunos casos o cese de crecimiento. Por otro lado, a 600 rpm, no se presenta ningún valor de  $qO_2$  debido a que el cultivo ya no se encontraba en fase de crecimiento.

Para complementar estos resultados y reforzar la interpretación de la  $qO_2$  como indicador del efecto hidrodinámico, existen algunas investigaciones, utilizando *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 en un biorreactor de tanque agitado (García-Ochoa et al., 2015; Gómez et al., 2015), también se determinó la  $qO_2$  a diferentes tiempos de cultivo bajo diversas

condiciones hidrodinámicas, variando la velocidad del agitador entre 100 y 700 rpm. Los resultados de esos estudios indicaron que el microorganismo puede verse influenciado por la hidrodinámica dentro del biorreactor. De manera similar a lo observado en nuestro trabajo con *A. vinelandii*, cuando la velocidad de agitación se incrementó por encima de un valor límite, alrededor de 450 rpm para *R. erythropolis*, la  $qO_2$  experimentó una disminución significativa. Esta correlación entre la disminución de la  $qO_2$  y el aumento de la hidrodinámica en diferentes especies bacterianas sugiere que  $qO_2$  podría ser un indicador de la respuesta celular frente a los efectos del cizallamiento.

Un estudio relevante con *Shimwellia blattae* (p424lbPSO) evaluó el efecto de la agitación (100–1200 rpm) en cultivos en biorreactor de tanque agitado (Acedos et al., 2019). Los autores demostraron que la velocidad de agitación no solo afecta el crecimiento celular y la viabilidad a altas velocidades (estrés hidrodinámico desde 800 rpm), sino que también modifica significativamente la distribución de metabolitos incluso antes de que se manifieste daño celular, lo cual tuvo un efecto en las rutas metabólicas activas. Estos hallazgos refuerzan nuestros resultados y sugieren que, en *A. vinelandii*, la hidrodinámica podría no solo influir en la VCO y  $qO_2$ , sino también modular la síntesis de bioproductos como alginato y PHB, lo que será analizado en detalle en las siguientes secciones.

Respecto a la comparación de los valores de  $qO_2$  obtenidos en este estudio con los reportados previamente (Díaz-Barrera et al., 2021; Ponce et al., 2021; Díaz-Barrera et al., 2014) es importante señalar que nuestros valores de VCO tienden a ser menores. Esta diferencia se atribuye principalmente a la metodología de determinación de la  $qO_2$  empleada ya que es primera vez que se desarrolla y aplica específicamente para *A. vinelandii*.

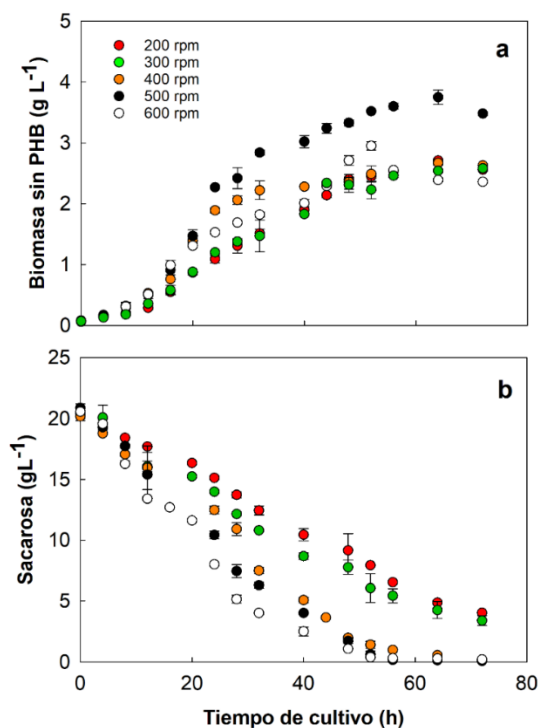
Al relacionar los parámetros hidrodinámicos con la VCO y  $qO_2$  a distintos tiempos de cultivo, estos indican que la hidrodinámica del sistema modula directamente la actividad respiratoria de *A. vinelandii*. A bajas velocidades de agitación (200–400 rpm), una transferencia de oxígeno eficiente sin generar efectos por cizallamiento. Sin embargo, al superar las 500 rpm, se observaron disminuciones en ambos parámetros, especialmente a las 24 y 48 h de cultivo. Esto se correlaciona con el aumento de parámetros como  $\epsilon_{promedio}$ ,  $\gamma_{máxima}$  y  $\tau_t$  que indican un aumento del estrés mecánico sobre las células. Aunque  $\lambda_s$  no sugiere lisis celular directa, los niveles elevados de velocidad de corte y esfuerzo cortante podrían inducir respuestas fisiológicas, como la reducción de la respiración específica ( $qO_2$ ) o el redireccionamiento metabólico hacia vías de mantenimiento o defensa, como la producción de alginato.

Por ello, es crucial analizar con más detalle la interacción entre el efecto hidrodinámico y la  $qO_2$  en las distintas condiciones operacionales. Si bien se ha determinado que por encima de 500 rpm podría existir un efecto hidrodinámico por cizalla que afecta el valor de  $qO_2$ , esta respuesta respiratoria es un indicio clave para comprender cómo estas condiciones hidrodinámicas podrían influir en la producción de metabolitos clave.

Estos resultados sugieren que la  $qO_2$  podría ser un indicador del efecto hidrodinámico sobre *A. vinelandii*. Sin embargo, para comprender completamente cómo este efecto se traduce en el bioproceso, es imprescindible evaluar en detalle el crecimiento celular y la producción de alginato y el PHB en estas mismas condiciones. Se podría determinar si este efecto hidrodinámico modula favorablemente ciertos parámetros clave del cultivo, o si, por el contrario, representa un efecto negativo para la célula.

#### 6.4.2. Influencia de la $qO_2$ sobre la producción de biomasa y consumo de sacarosa en cultivos por lotes de *A. vinelandii* a diferentes velocidades de agitación mediante pulsos de oxígeno

La Figura 6.7 muestra la concentración de biomasa, y sacarosa en cultivos por lotes de *A. vinelandii* a 200, 300, 400, 500 y 600 rpm con pulsos de oxígeno en la fase de crecimiento.



**Figura 6.7** Perfil de la producción de biomasa sin PHB (a) y consumo de sacarosa (b) en cultivos por lotes de *A. vinelandii* realizados en un biorreactor de 3 L a diferentes velocidades de agitación con pulsos de oxígeno.

Como se observó anteriormente, las velocidades de agitación seleccionadas entre 200 y 500 rpm se encuentran dentro de la meseta de la curva experimental de VCO v/s velocidad de agitación (Figura 6.3). Por otro lado, fue seleccionada la velocidad de agitación de 600 rpm puesto que ya se observa una disminución de la VCO.

En los cultivos realizados a 500 rpm se obtuvo una concentración máxima de biomasa de  $3,8 \pm 0,1 \text{ g L}^{-1}$  (64 h de cultivo), mientras que a 600 rpm se obtuvo una menor biomasa  $2,4 \pm 0,01 \text{ g L}^{-1}$  a las 72 h de cultivo. En cultivos a 200 y 300 rpm la concentración máxima de biomasa fue similar cercana a  $2,6 \pm 0,1 \text{ g L}^{-1}$  a las 72 h de cultivo. En cambio, a 400 rpm la concentración de biomasa se mantuvo constante en alrededor de  $2,7 \pm 0,04 \text{ g L}^{-1}$  a partir de 64 h de cultivo (Figura 6.7a).

Anteriormente se han reportado algunos trabajos sobre cultivos por lotes utilizando *A. vinelandii* ATCC 9046 sin pulsos de oxígeno, a 300, 500 y 700 rpm (Díaz-Barrera et al., 2021; Ponce et al., 2021). En estos trabajos se observa que entre 300 y 700 rpm se alcanzó una biomasa máxima entre 3,30 y 6,73  $\text{g L}^{-1}$  aproximadamente, valores mayores a lo reportado en este trabajo dado que la biomasa fue estimada sin descontar el contenido de PHB. Además, se podría indicar que, al agregar pulsos de oxígeno durante la fase de crecimiento del cultivo, podría tener un efecto sobre el crecimiento celular y la producción de PHB.

Si bien no existen estudios reportados específicamente sobre la adición de pulsos de oxígeno en *A. vinelandii*, es relevante destacar trabajos previos con otros microorganismos. Por ejemplo, Shekhawat et al., (2018) investigaron la utilización de pulsos de oxígeno para modular las fermentaciones de Chardonnay de *Lachancea thermotolerans* y *Saccharomyces cerevisiae*. Ellos observaron que estos pulsos cortos de oxígeno influenciaron positivamente tanto el crecimiento como el perfil aromático del vino, demostrando su potencial para mejorar el rendimiento global y la producción de diversos compuestos.

Respecto al consumo de sacarosa (Figura 6.7b), se observó que a 400, 500 y 600 rpm, la sacarosa fue consumida hasta valores cercanos de  $0,1 \text{ g L}^{-1}$ , indicando que la fuente de carbono limitó el crecimiento celular. Por otro lado, a 200 y 300 rpm, la sacarosa no fue consumida completamente, quedando una concentración de  $4,0 \pm 0,03 \text{ g L}^{-1}$  aproximadamente a las 72 h de cultivo. Se sabe que en cultivos de *A. vinelandii* por lotes la

constante de afinidad ( $K_s$ ) por la sacarosa es de  $0,1 \text{ g L}^{-1}$ , esto indica que los cultivos a 200 y 300 rpm no fueron limitados por la fuente de carbono.

A modo de comparación, investigaciones recientes con cultivos en lotes de *A. vinelandii* AT9 a diferentes VCO de  $3,6$  y  $12,4 \text{ mmol L}^{-1}\text{h}^{-1}$  también reportaron que los cultivos no estaban limitados por la fuente de carbono (Medina et al., 2023). Esta observación se correlaciona directamente con nuestros hallazgos, reforzando la conclusión de que, a bajas velocidades de agitación en nuestro estudio, la sacarosa no fue el nutriente limitante, y, por ende, no se consumió en su totalidad. A continuación, se muestran los parámetros de fermentación obtenidos en las cinéticas de cultivo en la Tabla 6.4.

**Tabla 6.4** Efecto de la velocidad de agitación sobre  $\mu$ ,  $Y_{x/s}$  y  $q_s$  en cultivos por lotes de *A. vinelandii* ATCC 9046 con pulsos de oxígeno.

Velocidad de agitación (rpm)	200	300	400	500	600
$Y_{x/s} \text{ (g g}^{-1}\text{)}$	$0,15 \pm 0,02$	$0,14 \pm 0,01$	$0,14 \pm 0,02$	$0,18 \pm 0,01$	$0,11 \pm 0,02^{**}$
$\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}$	$0,12 \pm 0,01$	$0,13 \pm 0,001$	$0,15 \pm 0,01$	$0,16 \pm 0,01^{**}$	$0,12 \pm 0,02$
$q_s \text{ (g g}^{-1} \text{ h}^{-1}\text{)}$	$0,09 \pm 0,01$	$0,10 \pm 0,01$	$0,10 \pm 0,01$	$0,09 \pm 0,01$	$0,11 \pm 0,02^{**}$

Los valores son promedios en cuadruplicado  $\pm$  errores estándar.  $\mu$ ,  $Y_{x/s}$  y  $q_s$  se estimaron utilizando biomasa sin PHB.

Los valores corresponden a promedios de tres réplicas independientes  $\pm$  desviación estándar. Las diferencias entre condiciones fueron evaluadas mediante análisis de varianza unidireccional (ANOVA). Se consideraron estadísticamente significativas según el siguiente criterio: \*  $P < 0,05$  (significativo), \*\*  $P < 0,01$  (muy significativo), \*\*\*  $P < 0,001$  (altamente significativo).

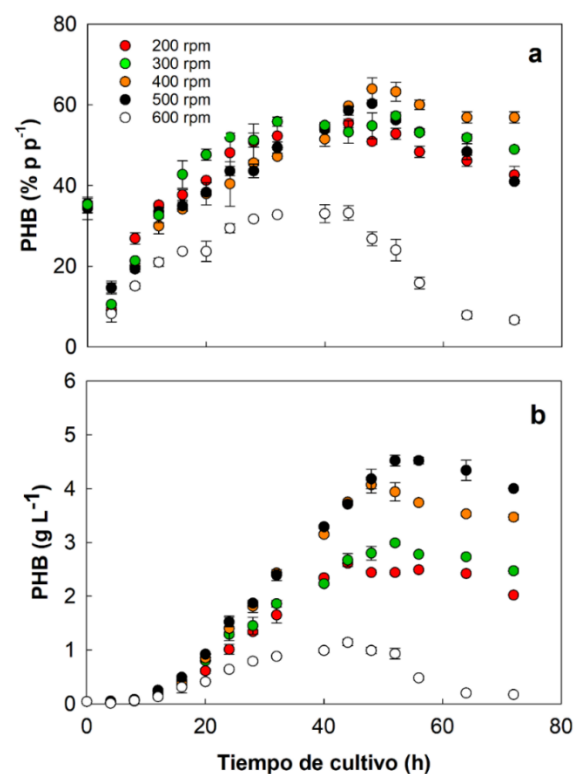
La Tabla 6.4 muestra los parámetros de cultivo obtenidos a diferentes velocidades de agitación. Se puede observar que  $\mu$  aumentó entre 200 y 500 rpm ( $0,12 - 0,16 \text{ h}^{-1}$ ) lo cual se correlaciona con el aumento de la velocidad de agitación. Sin embargo, a 600 rpm, la  $\mu$  disminuyó en un 20% respecto al valor obtenido a 500 rpm, esta disminución puede estar asociada a un efecto de la hidrodinámica. En un estudio previo, se demostró que a 700 rpm el valor  $\mu$  disminuyó, lo que es similar con nuestros resultados.

Con respecto a  $Y_{x/s}$ , se observa un aumento entre 200-500 rpm, sin embargo, a 600 rpm hay una disminución del 30% con respecto al obtenido a 500 rpm. En comparación con estos resultados, Díaz-Barrera et al., (2021) reportó que a 300 y 700 rpm  $Y_{x/s}$  fue similar los datos obtenidos (entre 0,26 y 0,31 g g<sup>-1</sup>)

En cuanto a la  $q_s$ , se puede observar que, entre 200 y 600 rpm, este valor estuvo en un rango de  $0,09 \pm 0,01$  a  $0,11 \pm 0,02$  (g g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>), destacando que no hay diferencias significativas entre la velocidad de agitación sobre la  $q_s$ . Contrastando estos resultados, Díaz-Barrera et al., (2021), reportó que en cultivos realizados a un  $VTO_{m\acute{a}x}$  de 19,2 mmol L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (700 rpm), hubo un incremento en el valor  $q_s$ , un efecto que se ha descrito previamente por otro autor (Peña et al., 2000). Ellos sugieren que este aumento de la  $q_s$  a mayores  $VTO_{m\acute{a}x}$  se debe a que la sacarosa se emplea principalmente para la "protección respiratoria", un mecanismo en el que las células "desperdician" oxígeno al adaptar la respiración o la VCO al nivel de exposición, incluso bajo condiciones limitantes (Inomura et al., 2017).

#### 6.4.3. Efecto de la velocidad de agitación sobre producción de PHB en cultivos por lotes de *A. vinelandii*

En la Figura 6.8 se observa la producción de PHB obtenida en cultivos de *A. vinelandii* con pulsos de oxígeno



**Figura 6.8** Perfil de acumulación de PHB (a) y producción de PHB (b) en cultivos por lotes de *A. vinelandii* realizados en un biorreactor de 3 L a diferentes velocidades de agitación.

En la figura 6.8a se muestran los perfiles de acumulación de PHB a las diferentes velocidades de agitación. Podemos observar que a 200 y 300 rpm se obtuvo una acumulación máxima similar entre  $55,4 \pm 1,04$  y  $57,3 \pm 0,90$  % p p<sup>-1</sup> entre las 44 y 52 horas de cultivo, luego de eso, se observa una disminución del PHB de alrededor de 12 a 15% respectivamente. Esta disminución también fue reportada por Díaz-Barrera et al (2016) en cultivos por lote de *A. vinelandii* ATCC 9046 en un reactor de 3L y bajo las mismas condiciones de cultivo que en la presente investigación, pero con presencia de extracto de levadura en el medio de cultivo, señalando que dicha disminución podría deberse al incremento de la actividad de despolimerización (Adaya et al., 2018; Jendrossek & Pfeiffer, 2014).

Entre 400 y 500 rpm se muestra que a las 48 h de cultivo se alcanza la máxima acumulación de PHB entre  $60,30 \pm 0,60$  y  $64,01 \pm 2,71$  % p p<sup>-1</sup>, luego de eso la acumulación disminuye en ambos casos, esto es con el agotamiento de la fuente de carbono y energía (ver Figura 7.8b) y el fin de la etapa de limitación por oxígeno. A 600 rpm, se muestra que la acumulación fue de  $33,22 \pm 1,81$  %p p<sup>-1</sup> a las 40 h de cultivo, disminuyendo hasta  $6,60 \pm 0,74$  % p p<sup>-1</sup>. Dicha disminución en la acumulación de PHB podría ser consecuencia de la degradación del PHB a fin de ser utilizado como fuente de carbono y energía para la mantención celular y el proceso de fijación de nitrógeno ante el agotamiento de la sacarosa, tal como fue descrito por Senior et al., (1972) para cultivos por lotes de *A. beijerinckii* en diazotrofia.

Respecto del perfil de producción de PHB, en la figura 6.9b se muestra que, entre 200 y 300 rpm la producción de PHB estuvo entre  $2,51 \pm 0,01$  y  $3,03 \pm 0,03$  g L<sup>-1</sup>. A 400 y 500 rpm la producción de PHB fue de alrededor  $4,52 \pm 0,21$  g L<sup>-1</sup>. Finalmente, a 600 rpm se observa que, a las 44 h de cultivo se obtiene un valor máximo de  $1,14 \pm 0,12$  g L<sup>-1</sup> de PHB.

En la tabla 6.5 se muestran los rendimientos de sacarosa en PHB ( $Y_{PHB/S}$ ) y la productividad volumétrica de PHB ( $Q_{PHB}$ ).

**Tabla 6.5** Efecto de la velocidad de agitación en la producción de PHB en cultivos por lotes de *A. vinelandii* ATCC 9046 en biorreactor de 3 L

Velocidad de agitación (rpm)	200	300	400	500	600
$Y_{\text{PHB/S}}$ (g g <sup>-1</sup> )	0.17 ± 0.02	0.20 ± 0.01	0.22 ± 0.02	0.22 ± 0.01	0.05 ± 0.02**
$Q_{\text{PHB}}$ (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	0.04 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.08 ± 0.03	0.09 ± 0.01**	0.01 ± 0.02

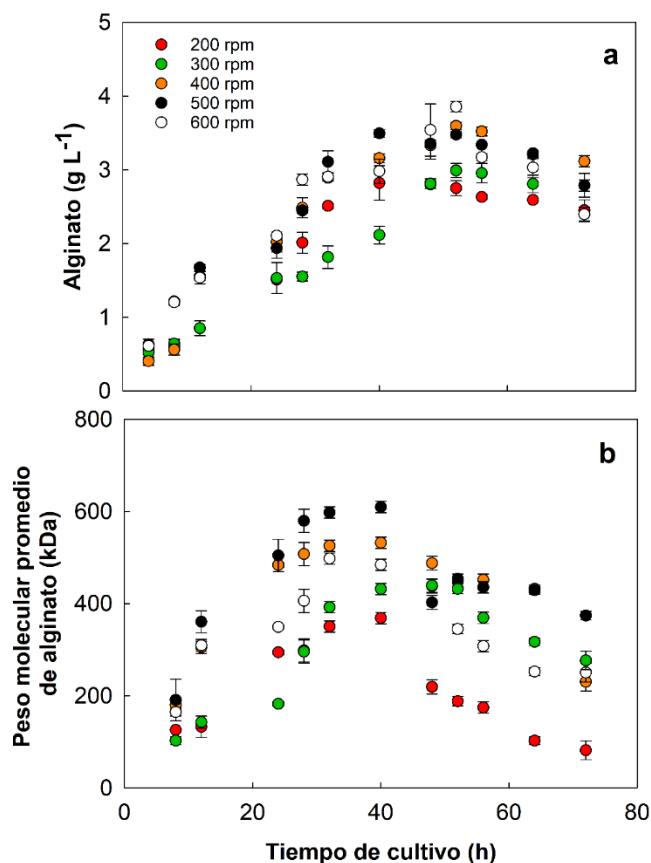
Los valores corresponden a promedios de tres réplicas independientes ± desviación estándar. Las diferencias entre condiciones fueron evaluadas mediante análisis de varianza unidireccional (ANOVA). Se consideraron estadísticamente significativas según el siguiente criterio: \* P < 0,05 (significativo), \*\* P < 0,01 (muy significativo), \*\*\* P < 0,001 (altamente significativo).

De la Tabla 6.5 se desprende que, se obtuvo un mayor  $Y_{\text{PHB/S}}$  a 400 y 500 rpm (0,22 ± 0,01 g g<sup>-1</sup>) y a 600 rpm se obtuvo un rendimiento casi un 80% menor respecto de 500 rpm (0,05 ± 0,02 g g<sup>-1</sup>). Respecto de la  $Q_{\text{PHB}}$  se observa un incremento entre 0,04 ± 0,01 y 0,09 ± 0,01 (g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) entre 200 y 500 rpm. Luego al aumentar la velocidad de agitación a 600 rpm este valor disminuye a 0,01 ± 0,02 (g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>). Díaz-Barrera et al., (2016) determinaron que en los cultivos que utilizan la bacteria de tipo silvestre, se obtuvo un mayor valor de  $Q_{\text{PHB}}$  (0,13 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) a 400 y 500rpm utilizando extracto de levadura como fuente de nitrógeno.

Al complementar la producción de PHB con la influencia de la hidrodinámica sobre la  $q_{\text{O}_2}$ , nuestros resultados muestran que, a 600 rpm, la disminución tanto de la actividad respiratoria ( $q_{\text{O}_2}$  y VCO) como de la producción de PHB fue considerable. Este hallazgo sugiere una fuerte interacción entre las condiciones hidrodinámicas extremas y la fisiología celular, afectando dos procesos metabólicos clave. Sin embargo, surgen dos interrogantes cruciales que se deberán dilucidar más adelante: ¿La disminución del PHB se debe directamente a este efecto de cizallamiento, o la aplicación de los pulsos de oxígeno también modula esta respuesta metabólica, especialmente en lo que respecta a la asignación de carbono hacia la acumulación de PHB?

#### 6.4.4. Efecto de la velocidad de agitación sobre la producción de alginato en cultivos por lotes de *A. vinelandii*

La Figura 6.9 muestra la concentración de alginato y el PMP de alginato en cultivos en lotes de *A. vinelandii* realizados a 200, 300, 400, 500 y 600 rpm.



**Figura 6.9** Perfil de producción de alginato (a) y peso molecular promedio de alginato (b) en cultivos por lotes de *A. vinelandii* realizados en un biorreactor de 3 L a diferentes velocidades de agitación.

En la Figura 6.9a se muestra la evolución de la concentración de alginato a diferentes velocidades de agitación, donde se obtuvo una concentración máxima de alginato de  $4,0 \pm 0,1 \text{ g L}^{-1}$  (56 h) en los cultivos realizados a 600 rpm. El alginato entre 400 y 500 rpm fue similar ( $3,5 \pm 0,1 \text{ g L}^{-1}$ , 56 h) mientras que, a 200 y 300 rpm, se obtuvo una producción de alginato menor ( $2,8 \pm 0,2$  y  $3,0 \pm 0,2 \text{ g L}^{-1}$  a 56 h). A modo de complementar estos resultados, se ha reportado una producción de alginato desde 2,87 a  $4,17 \text{ g L}^{-1}$ , en cultivos a 300, 500 y 700 rpm, estos se llevaron a cabo en condiciones similares a las de este trabajo, pero sin pulsos de oxígeno. Estos resultados, demuestran que al aumentar la velocidad de agitación se incrementa la producción de alginato, previamente reportado por varios autores (Diaz-

Barrera et al., 2021; Ponce et al., 2021; Díaz-Barrera et al., 2014; Lozano et al., 2011; Peña et al., 2000).

La Figura 6.9b muestra el PMP del alginato. En los cultivos desarrollados a 200 rpm el PMP máximo del alginato fue de  $219 \pm 15$  kDa (48 h). En los cultivos desarrollados a 300 rpm el PMP máximo del alginato fue de  $439 \pm 25$  (kDa) a las 48 h de cultivo. En los cultivos desarrollados a 400 rpm el PMP máximo del alginato fue de  $488 \pm 36$  kDa (48 h). El PMP máximo del alginato obtenido fue de  $504 \pm 15$  kDa durante 48 h de cultivo a 500 rpm. En los cultivos a 600 rpm el PMP máximo del alginato fue de  $437 \pm 14$  kDa (48 h). En todos los cultivos, el PMP máximo del alginato se obtuvo durante la fase de crecimiento celular, y luego disminuyó en la fase preestacionaria.

Ponce et al., (2021) observó que, en cultivos por lotes de *A. vinelandii* en diazotrofia a 500 rpm, el peso molecular del alginato disminuyó de 607 a 385 kDa entre 40 y 48 h de cultivo. Se sabe que una disminución del peso molecular del alginato durante el cultivo puede explicarse por la acción de las alginato liasas (Ponce et al., 2021; Flores et al., 2013; Trujillo-Roldán, et al., 2004) codificadas por seis genes de alginato liasa en *A. vinelandii* (Gimmestad et al., 2009). Por otra parte, se ha descrito que las alginato liasas (Alys) juegan un papel clave en la catálisis de la degradación del alginato a través de una vía enzimática, asegurando que el proceso de degradación del alginato es altamente específico y eficiente debido a su especificidad de sustrato, modo de acción y alta actividad enzimática (Cheng et al., 2020; B. Zhu & H, Yin, 2015).

En la Tabla 6.6 se muestran los rendimientos de sacarosa en producto ( $Y_{Alg/S}$ ) y en biomasa ( $Y_{Alg/x}$ ) y la productividad específica volumétrica de alginato ( $q_P$ ).

**Tabla 6.6** Efecto de la velocidad de agitación en la producción de alginato en cultivos por lotes de *A. vinelandii* ATCC 9046 en un biorreactor de 3 L

Velocidad de agitación (rpm)	200	300	400	500	600
$Y_{Alg/x}$ (g g <sup>-1</sup> )	$1.13 \pm 0.01$	$1.14 \pm 0.02$	$1.20 \pm 0.01$	$1.20 \pm 0.01$	$1.34 \pm 0.01^{**}$
$Y_{Alg/s}$ (g g <sup>-1</sup> )	$0.21 \pm 0.02$	$0.21 \pm 0.01$	$0.20 \pm 0.03$	$0.18 \pm 0.01$	$0.20 \pm 0.02$
$q_{Alg}$ (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	$0.02 \pm 0.01$	$0.02 \pm 0.01$	$0.02 \pm 0.01$	$0.02 \pm 0.01$	$0.07 \pm 0.02^{**}$

Los valores corresponden a promedios de tres réplicas independientes  $\pm$  desviación estándar.

Las diferencias entre condiciones fueron evaluadas mediante análisis de varianza unidireccional (ANOVA). Se consideraron estadísticamente significativas según el siguiente criterio: \*  $P < 0,05$  (significativo), \*\*  $P < 0,01$  (muy significativo), \*\*\*  $P < 0,001$  (altamente significativo).

En la Tabla 6.6 se muestran los parámetros de fermentación sobre la producción de alginato obtenidos bajo las condiciones evaluadas. De acuerdo con el  $Y_{Alg/X}$  se puede observar que entre 200 y 500 rpm el rendimiento hay un incremento entre  $1,13 \pm 0,01$  a  $1,2 \pm 0,01$   $g\ g^{-1}$ . A 600 rpm el valor de  $Y_{Alg/X}$  es ligeramente mayor ( $1,34\ g\ g^{-1}$ ) esto se debe a que hay un aumento de alginato y la acumulación de biomasa sin PHB es menor a 600 rpm.

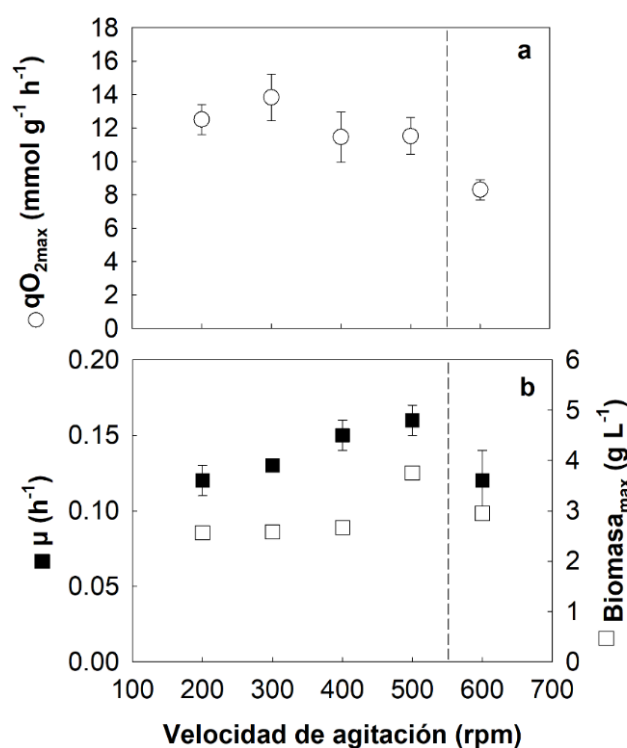
Respecto a los valores obtenidos a 600 rpm, estudios previos con *P. aeruginosa* han descrito que un incremento en el  $Y_{Alg/X}$  podría estar asociado a una copia extra del gen *alg8*, el cual codifica para una polimerasa clave en la síntesis de alginato (Remminghorst & Rehm, 2006). Si bien nuestros resultados no incluyen un análisis de expresión de genes, el incremento observado en el  $Y_{Alg/X}$  en *A. vinelandii* a 600 rpm podría indicar cambios a nivel de la expresión del gen *alg8* o de otros genes relacionados con la vía de síntesis de alginato, como una posible adaptación de la bacteria a las condiciones de alto cizallamiento.

Con respecto al  $Y_{Alg/S}$ , se puede observar que un aumento en la velocidad de agitación no tiene influencia en los valores de  $Y_{Alg/S}$ . De acuerdo con lo publicado por otros autores, se han observado valores de  $Y_{Alg/S}$  muy similares para las condiciones de estudio (Díaz-Barrera et al., 2021; Ponce et al., 2021, Díaz-Barrera et al., 2014). En cuanto a la  $q_p$ , se observa que a 600 rpm se obtuvo el valor de  $0,07 \pm 0,02\ g\ L^{-1}\ h^{-1}$ , el cual es mayor con respecto a las otras condiciones, siendo estadísticamente significativo.

A 600 rpm, si bien la hidrodinámica genera una disminución de la VCO y afecta la concentración de biomasa (posiblemente con un efecto subletal reflejado en la disminución de la  $qO_2$ , la  $\mu$  y PHB previamente descritas), *A. vinelandii* podría redirigir el flujo de carbono y energía hacia la vía de síntesis de alginato a expensas de otros procesos como el crecimiento o la acumulación de PHB. Este fenómeno podría interpretarse como una respuesta de estrés que induce una mayor producción de alginato incluso en condiciones adversas. Por lo tanto, el incremento de la  $q_p$  a 600 rpm es compatible con la existencia de un efecto hidrodinámico subletal, al indicar una modulación metabólica que prioriza la producción de alginato como mecanismo de defensa o supervivencia, aunque el costo sea una menor actividad respiratoria general y un menor peso molecular del polímero.

## 6.5. Relación entre el efecto de la $qO_{2max}$ y el crecimiento celular en cultivos por lotes de *A. vinelandii*

En la Figura 6.10 se muestran los valores de la  $qO_{2max}$  y los valores de los parámetros cinéticos de crecimiento ( $\mu$  y biomasa máxima) los cuales se encuentran representados en función de la velocidad de agitación.

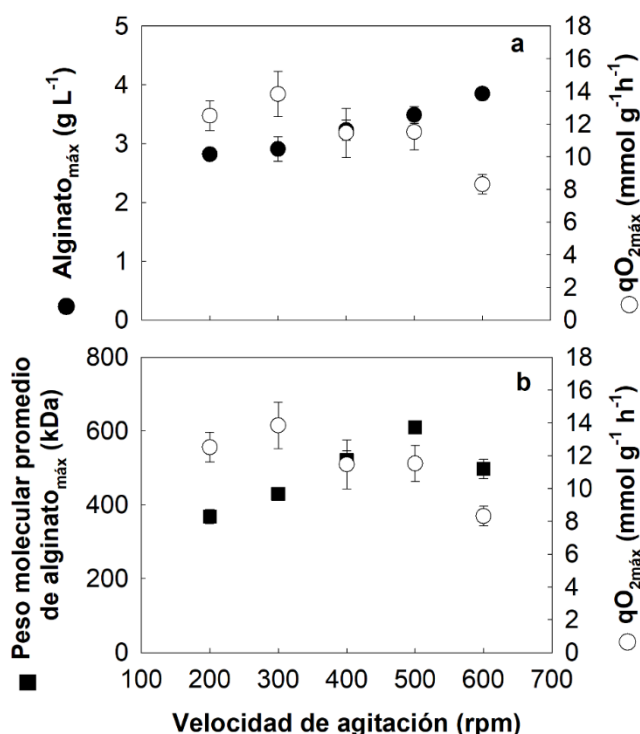


**Figura 6.10** Relación entre la  $qO_{2max}$ ,  $\mu$  y biomasa<sub>max</sub> en cultivos por lotes de *A. vinelandii* a diferentes velocidades de agitación.

Como se observa en la Figura 6.10a, un aumento en la velocidad de agitación entre 200 y 500 rpm mantuvo la  $qO_{2max}$  relativamente constante, con valores que oscilaron alrededor de 12 - 14 mmol g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Esto podría indicar que, dentro de este rango, la célula es capaz de mantener su actividad respiratoria máxima específica, a pesar de los cambios en las condiciones hidrodinámicas. Por el contrario, en la figura 6.10b muestra que, un aumento en la velocidad de agitación entre 200 y 500 rpm provocó un aumento en  $\mu$ , debido al aumento de la transferencia de oxígeno, lo que resultó en un aumento de  $\mu$  entre  $0,12 \pm 0,01$  y  $0,16 \pm 0,01$  h<sup>-1</sup>, incrementando la concentración máxima de biomasa alcanzada desde  $2,56 \pm 0,02$  a  $3,75 \pm 0,12$  g L<sup>-1</sup>. A 600 rpm, sin embargo, la  $\mu$  y la biomasa máxima disminuyeron, lo que coincide con la disminución en la  $qO_{2max}$ , sugiriendo que si hay un efecto de las condiciones hidrodinámicas sobre el crecimiento.

## 6.6. Relación entre el efecto de la $qO_2$ y la producción de alginato en cultivos por lotes de *A. vinelandii*

Para comprender la influencia de la actividad respiratoria máxima en la producción de alginato, la Figura 6.11 presenta la  $qO_{2\text{máx}}$  en relación con la concentración máxima de alginato (Figura 6.11a) y el peso molecular promedio máximo del alginato (Figura 6.12b) en función de la velocidad de agitación.



**Figura 6.11** Relación entre la producción de alginato y  $qO_{2\text{máx}}$  en cultivos por lotes de *A. vinelandii* a diferentes velocidades de agitación.

Como se observa en la Figura 6.11a, entre 200 y 500 rpm, donde la  $qO_{2\text{máx}}$  se mantuvo entre 12 y 14  $\text{mmol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ , la concentración máxima de alginato aumentó alcanzando su valor máximo a 600 rpm. Esto podría ser asociado a que, la célula parece redirigir recursos para maximizar la producción de alginato en condiciones de alto cizallamiento sin embargo es necesario realizar un estudio donde la velocidad de agitación sea más alta para comprobar lo que se plantea.

Por otra parte, la Figura 6.11b muestra una relación inversa entre la  $qO_{2\text{máx}}$  y el  $\text{PMP}_{\text{máx}}$  del alginato. A medida que la  $qO_{2\text{máx}}$  aumenta entre 200 y 500 rpm, el  $\text{PMP}_{\text{máx}}$  del alginato tiende a aumentar, alcanzando el valor máximo a 500 rpm. No obstante, a 600 rpm, la disminución de la  $qO_{2\text{máx}}$  coincide con una disminución en el  $\text{PMP}_{\text{máx}}$  de alginato. Esta tendencia sugiere que las condiciones hidrodinámicas que reducen la  $qO_{2\text{máx}}$  podrían también

estar afectando el tamaño del polímero. Una posible explicación es que, a altas velocidades de agitación, se genere un mayor estrés oxidativo, producto del aumento en la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), derivadas del metabolismo respiratorio acelerado (Imlay, 2018). En este contexto, el estudio de Dingier y Oelze (1987) resulta particularmente relevante: estos autores cultivaron *A. vinelandii* utilizando en cultivo continuo bajo diferentes concentraciones de oxígeno disuelto (entre 1 % y 90 % de saturación) y demostraron que, a mayor disponibilidad de oxígeno, la actividad de la superóxido dismutasa (SOD), una enzima clave en la defensa frente al estrés oxidativo, aumentaba significativamente, tanto en términos específicos como por célula. Villa et al., (2012) estudiaron el efecto del estrés oxidativo subletal crónico en *A. vinelandii* demostrando que este estrés puede modular procesos fisiológicos esenciales, como la formación de biofilms y la producción de exopolisacáridos, entre ellos el alginato. En particular, la exposición prolongada a niveles subletales de especies reactivas de oxígeno induce respuestas adaptativas que afectan la biosíntesis y la integridad del polímero

Estos hallazgos refuerzan la idea de que *A. vinelandii* responde al exceso de oxígeno disuelto activando rutas de defensa que podrían redirigir recursos metabólicos, comprometiendo procesos como la síntesis y elongación del alginato. Por otra parte, un aumento en la actividad de enzimas liasas que degradan el polímero bajo condiciones desfavorables podría explicar la reducción del peso molecular promedio máximo ( $PMP_{m\acute{a}x}$ ) observada a 600 rpm. Trujillo-Roldán et al. (2004) investigaron los roles del complejo de la polimerasa y la alginato-liasa en la determinación del peso molecular promedio del alginato producido por *A. vinelandii*. En su estudio, compararon la bacteria silvestre (*A. vinelandii* ATCC 9046) con una bacteria mutante (SML2), incapaz de producir alginato-liasa, para diferenciar entre los procesos de polimerización y despolimerización. La alginato-liasa demostró ser fundamental en la degradación del alginato en el microorganismo silvestre, actuando después de la polimerización. En contraste, la bacteria mutante no presentó despolimerización ni actividad enzimática detectable, lo que resalta la importancia específica de esta enzima en la modulación del polímero. Durante el cultivo de *A. vinelandii* ATCC 9046, se observó una disminución significativa en el PMP del alginato a partir de las 14 horas, coincidiendo con un aumento en la actividad de la alginato-liasa. Esta caída en el PMP se correlacionó linealmente con el producto de la actividad específica de la alginato-liasa y la concentración final de alginato, indicando que la degradación del polímero está directamente influenciada por la acción de la enzima hacia el final de la fermentación. Esta degradación puede representar una respuesta adaptativa para mantener la estabilidad del biopolímero frente a cambios en la viscosidad y tensión mecánica del medio, afectando directamente las propiedades físicas y funcionales del alginato producido. Así, el equilibrio entre síntesis y

degradación del polímero estaría modulada por las condiciones operativas del cultivo, lo que explicaría las variaciones observadas en el  $PMP_{m\acute{a}x}$ .

Aunque este estudio se ha centrado en la relación entre la hidrodinámica del biorreactor y la actividad respiratoria de *A. vinelandii*, así como la producción de alginato y PHB bajo la adición de pulsos de oxígeno, existen algunas interrogantes sobre los mecanismos subletales que operan a nivel celular y sus repercusiones en el producto final. Además de los cambios morfológicos, se realizará un estudio detallado de la expresión de genes clave que intervienen en la biosíntesis de alginato, la respiración, la fijación de nitrógeno y genes que intervienen en el estrés celular. Esto permitirá determinar si existe efectivamente un efecto hidrodinámico a nivel celular, evidenciado a través de cambios en la expresión génica. La comprensión integral de estos factores, junto con las características fisicoquímicas del alginato (peso molecular, grado de acetilación y relación G/M), proporcionará una visión más completa de la respuesta de este microorganismo a las condiciones hidrodinámicas y permitirá diseñar estrategias para obtener un alginato con características reproducibles.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIONES SEGUNDO OBJETIVO

Los resultados presentados en este capítulo, correspondientes al segundo objetivo, se realizaron en cotutela bajo la dirección de la **Profesora Victoria Santos**, Catedrática del Departamento de [Ingeniería Química y de Materiales](#) de la **Universidad Complutense de Madrid**, España, en el grupo de investigación [Fisicoquímica de procesos industriales y medioambientales](#) (FQPIMA).

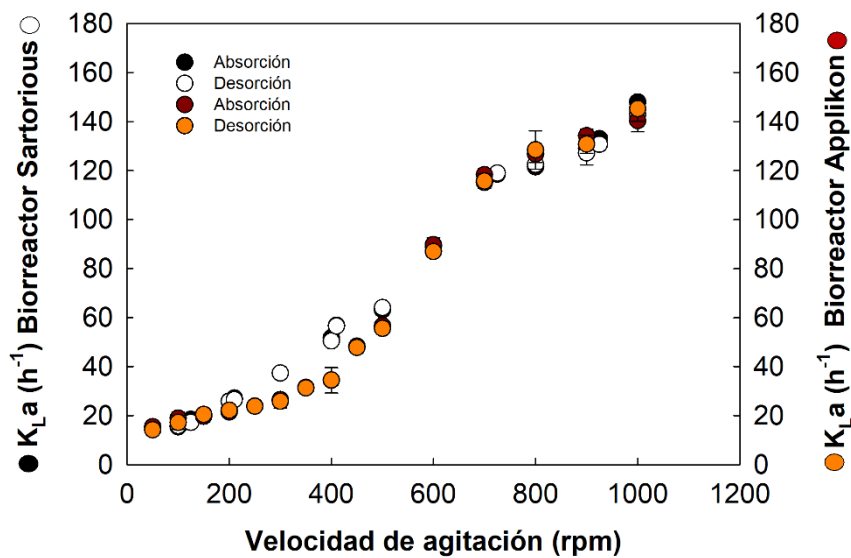
### 7.1. Caracterización de la transferencia de oxígeno en biorreactor tanque agitado a través del método físico de desgaseo

En primer lugar, se llevó a cabo una traslación de escala del biorreactor empleado en los experimentos realizados en el capítulo anterior (de 3 L volumen total con un volumen útil de 1,5 L marca Applikon), al biorreactor disponible en las instalaciones de la UCM; (un biorreactor de 2 L de volumen total con un volumen útil de 1,5 L marca Sartorius), ambos detallados en el Capítulo de Materiales y Métodos sección 5.7.1. Para ello se utilizó el principio de semejanza geométrica considerando que se utilizaron dos turbinas Rushton, mediante las medidas de la distancia entre cada impulsor, la distancia de los baffles de los biorreactores, la distancia del difusor del aire respecto de los impulsores y la distancia entre la toma de muestra e impulsores.

Luego se realizó una caracterización del biorreactor a través de la medición de  $k_L a$  utilizando el método de desgaseo. Esta elección se fundamentó en la importancia del oxígeno en cultivos aerobios y las dificultades inherentes a la transferencia de oxígeno debido a su baja solubilidad y la alta resistencia existente (Diaz & Acevedo, 1999; Ju & Chase, 1992). Se mantuvieron las condiciones de cultivo, utilizando el medio de cultivo que se empleará en los experimentos y manteniendo las proporciones de cada reactivo a utilizar señalados anteriormente en el Capítulo de Materiales y Métodos sección 5.1.4.

En la Figura 7.1 se muestra el perfil de  $k_L a$  por el método de desgaseo en ambos biorreactores. Los experimentos en el biorreactor Sartorius (círculos color negro y blanco) se realizaron por triplicado, y fue ejecutado en un rango entre 100 y 1000 rpm. Tanto en la curva de desorción como la de absorción fue utilizado aire comprimido para realizar 100% de saturación de aire y nitrógeno gaseoso para realizar 0% de saturación de aire. Como se observa los valores obtenidos experimentalmente, abarcan valores entre  $15,4 \pm 0,4$  y 147,9

$\pm 0,7 \text{ h}^{-1}$  en la curva de absorción y valores entre  $15,9 \pm 0,9$  y  $142,8 \pm 0,9 \text{ h}^{-1}$  en la curva de desorción. Si bien estos valores difieren un poco de la caracterización realizada en el biorreactor Applikon (círculos color rojo y naranja) por ende, a través de una regresión matemática se logró obtener una ecuación de tipo exponencial, y con ella se determinó la velocidad de agitación para mantener el  $k_L a$  inicial en el sistema. Además, se estimó el tiempo de respuesta del electrodo (Sección 5.4). Cabe destacar que, bajo las condiciones estudiadas, fue necesario aplicar una corrección en la respuesta del electrodo para las velocidades de agitación de 800, 900 y 1000 rpm.



**Figura 7.1** Curvas de desorción y absorción para la determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ( $k_L a$ ) mediante el método dinámico sin células.

En la Tabla 7.1 se muestran los diferentes valores de  $VTO_{m\acute{a}x}$  calculado a partir del valor obtenido de  $k_L a$ . Estos valores se encuentran entre  $38 \pm 0,1$  y  $34,5 \pm 0,9 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  y son similares a los reportados previamente calculando el balance de gases de salida del biorreactor (Ponce et al., 2021; Díaz-Barrera et al., 2021; Díaz-Barrera, Gutierrez, et al., 2014).

Tras una exhaustiva caracterización de la actividad respiratoria ( $qO_2$ ) de *A. vinelandii* ATCC 9046 a diferentes velocidades de agitación, realizada mediante pulsos de oxígeno como parte del primer objetivo del estudio (Sección 6.1), se pudo establecer y comprender un rango relevante de condiciones hidrodinámicas. Dicha caracterización fue fundamental para identificar las condiciones que influyen de manera significativa la respiración del microorganismo y, por ende, su metabolismo. De acuerdo con la curva experimental que relaciona la velocidad de agitación con la VCO, la cual está intrínsecamente ligada a la VTO

del sistema en cultivos por lotes de *A. vinelandii* en condiciones de diazotrofia (Figura 6.3), se procedió a seleccionar un conjunto específico de velocidades para una investigación más detallada de su influencia en el rendimiento del cultivo. Las velocidades de agitación seleccionadas fueron: 100, 300, 500, 700 y 900 rpm.

**Tabla 7.1** Estimación de la  $VTO_{\text{máx}}$  utilizando  $k_{L,a}$  por método dinámico sin células

<b>Velocidad de agitación (rpm)</b>	<b><math>VTO_{\text{máx}}</math> (mmol L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>)</b>
100	3,7 ± 0,1
125	4,3 ± 0,2
200	6,2 ± 0,03
210	6,4 ± 0,1
300	8,9 ± 0,01
400	12,1 ± 0,2
410	13,5 ± 0,1
500	15,1 ± 0,2
600	21,2 ± 0,1
700	27,4 ± 0,01
725	28,2 ± 0,1
800	29,0 ± 0,3
900	30,4 ± 0,3
925	31,3 ± 0,4
1000	34,5 ± 0,9

Los valores corresponden a promedios de tres réplicas independientes ± desviación estándar.

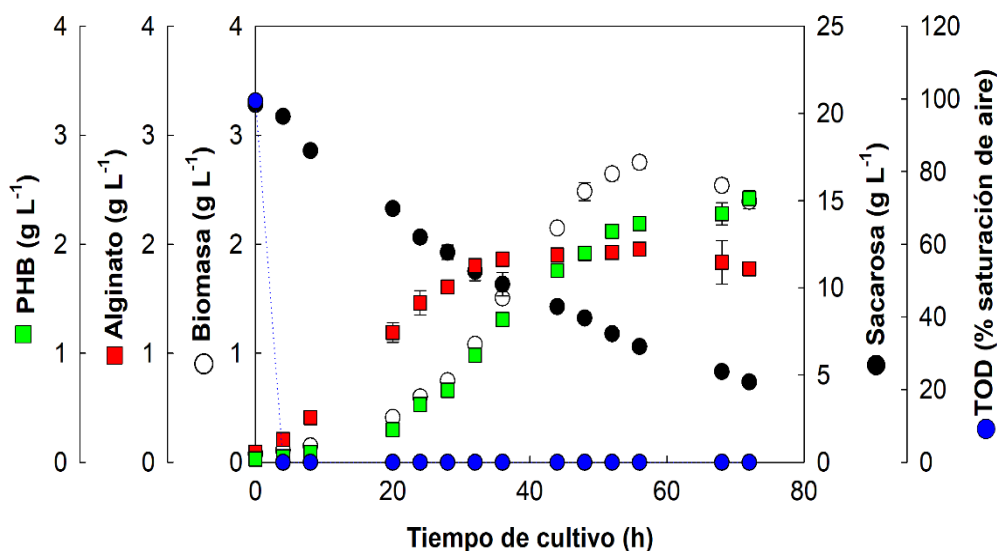
## **7.2. Efecto comparativo de la velocidad de agitación (100 vs. 900 rpm) sobre el metabolismo de *A. vinelandii* ATCC 9046**

A continuación, se presentan los resultados de la influencia de la velocidad de agitación (100 y 900 Rpm) y por ende de  $VTO_{\text{máx}}$  y/o  $VCO_{\text{máx}}$  (3,7 ± 0,1 y 34,5 ± 0,9 mmol L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) en cultivos de *A. vinelandii* ATCC9046, con el objetivo de analizar su influencia sobre el crecimiento, consumo de sacarosa, producción de alginato y PHB, así como la TOD.

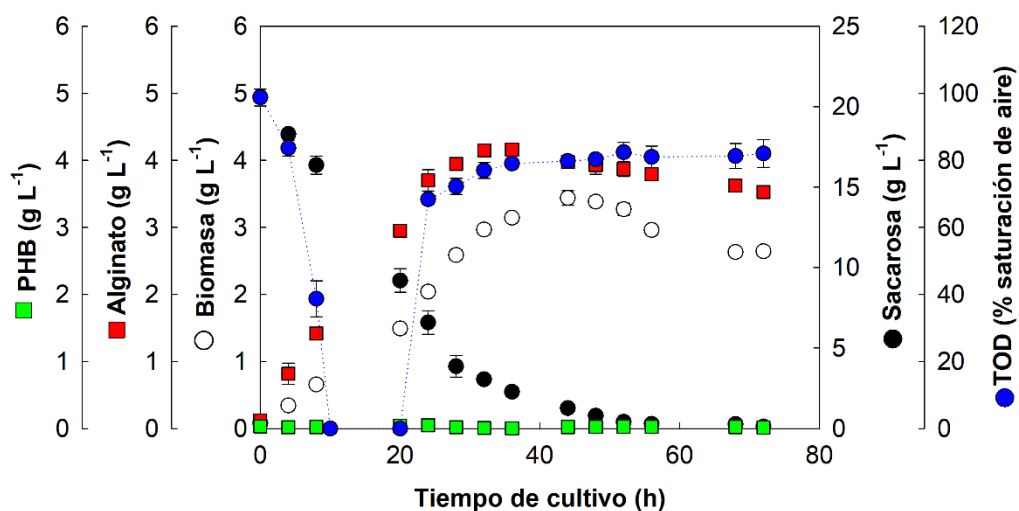
Se ha estudiado la evolución de biomasa, sacarosa, PHB, alginato y TOD a lo largo del tiempo, empleando como ejemplos comparativos los cultivos a 100 rpm (Figura 7.2) y 900 rpm (Figura 7.3). En la Figura 7.2 se muestra la evolución del crecimiento, el consumo de

sacarosa, la TOD, la producción de alginato y PHB en cultivos de *A. vinelandii* ATCC9046 a 100 rpm. Se puede observar que, el crecimiento de la biomasa y la producción de PHB están completamente asociados. La producción de alginato comienza desde el inicio del cultivo y se mantiene constante desde las 35 horas, antes de que el cultivo se encuentre en fase estacionaria. El producto principal del proceso en estas condiciones es el PHB. El consumo de sacarosa disminuye a lo largo de cultivo, sin embargo, no se agota por completo, lo que indicaría que no es el factor limitante del proceso. Por otra parte, La TOD disminuye a valores cercanos a cero a tiempos tempranos del cultivo, por lo que el proceso global parece estar limitado por la VTO. La baja disponibilidad de oxígeno podría desviar el metabolismo hacia la acumulación de PHB, un biopolímero de reserva típico en condiciones de limitación de oxígeno con exceso de carbono.

Contrastando estos resultados con los de la Figura 7.3, que muestra la evolución del experimento realizado a 900 rpm, se puede observar que el crecimiento de la biomasa y la producción de alginato están también completamente asociados, siendo el alginato el producto principal. La producción de PHB es cercana a cero durante el cultivo, lo que podría indicar que la disponibilidad de oxígeno no induce a la acumulación de PHB. El consumo de sacarosa disminuye a lo largo del cultivo llegando valores cercanos a cero luego de las 48 h de cultivo e indicando que es el factor limitante del cultivo en estas condiciones, observándose, incluso, una pequeña disminución en la concentración de alginato, seguramente consumido por las células para su mantenimiento. Por otra parte, la TOD disminuye a valores cercanos a cero a las 10 h de cultivo, sin embargo, esta limitación es solo de 10 h. Posteriormente la TOD aumenta durante la fase de crecimiento hasta alcanzar un valor constante cercano al 80% de saturación de aire a partir de las 32 h de cultivo. Esta mayor disponibilidad de oxígeno podría permitir un metabolismo más oxidativo, favoreciendo la producción de alginato.



**Figura 7.2** Evolución de la concentración de biomasa, sacarosa, alginato, PHB y TOD en cultivos por lotes de *A. vinelandii* ATCC 9046 a 100 rpm y flujo de aire de 1,5 L min<sup>-1</sup>.



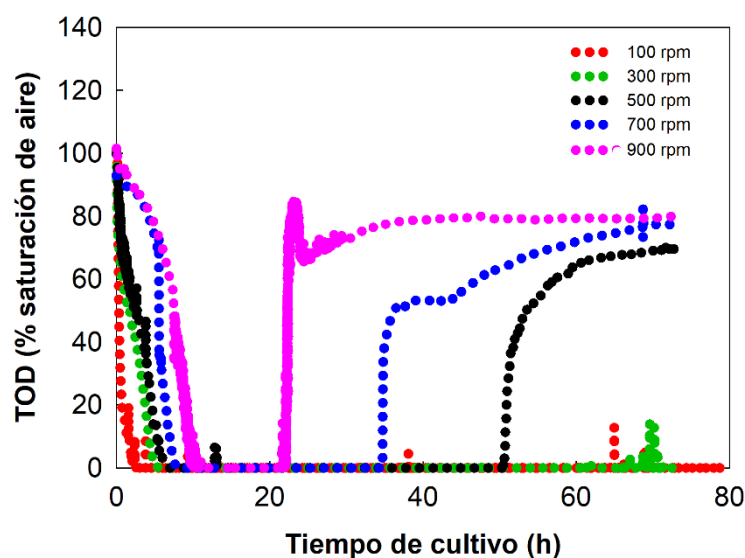
**Figura 7.3** Evolución de la concentración de biomasa, sacarosa, alginato, PHB y TOD en cultivos por lotes de *A. vinelandii* ATCC 9046 a 900 rpm y flujo de aire de 1,5 L min<sup>-1</sup>.

La velocidad de agitación, al afectar directamente a VTO y, consecuentemente a VCO, es un factor determinante en el metabolismo de *A. vinelandii* ATCC9046. A una baja VTO (100 rpm) limita la disponibilidad de oxígeno, promoviendo la producción de PHB y haciendo que el oxígeno sea el factor limitante. Por otro lado, a una alta VTO (900 rpm) asegura una mayor disponibilidad de oxígeno, lo que favorece el crecimiento de la biomasa y la producción de alginato, y desplaza la limitación hacia la sacarosa.

Con estos resultados, se profundizará en el estudio del efecto de la velocidad de consumo de oxígeno ( $qO_2$ ) y por ende de la VTO sobre la calidad del alginato y los parámetros de respiración celular utilizando *A. vinelandii* ATCC 9046 mediante cultivos por lotes y en condiciones de diazotrofia, observando la evolución de todos los compuestos en función de la variable estudiada y, de forma cuantitativa, mediante la determinación de los rendimientos máximos obtenidos de la biomasa y los dos productos; las velocidades de crecimiento, consumo de sustrato y formación de productos; y la productividad y selectividad alcanzadas en cada experimento.

### **7.3. Influencia de la velocidad de agitación y/o VTO sobre la TOD, crecimiento, sacarosa y producción de PHB en cultivos por lotes de *A. vinelandii* ATCC 9046**

Se realizaron cultivos de *A. vinelandii* ATCC 9046 para determinar el efecto de la VTO sobre el crecimiento, consumo de sacarosa y producción de PHB. Se determinó la evolución del TOD para los cultivos de *A. vinelandii* ATCC 9046 realizados en un biorreactor de 2 L a diferentes velocidades de agitación. La Figura 7.4 presenta los perfiles típicos de TOD en cultivos de *A. vinelandii* ATCC 9046 a todas las velocidades de agitación estudiadas (Ponce et al., 2021a; Díaz-Barrera et al., 2021; Díaz-Barrera, Gutierrez, et al., 2014). La TOD alcanzó valores cercanos a cero a las diferentes velocidades de agitación, lo que demuestra el alto nivel de respiración de las células de *A. vinelandii*. Este nivel de TOD (casi cero) se mantuvo por periodos de 18 a 40 h, dependiendo de la velocidad de agitación del cultivo (500, 700 y 900 rpm). Posteriormente, a estas velocidades más altas, el valor de la TOD aumentó, coincidiendo con el cese del crecimiento celular. Este fenómeno se relaciona con que una mayor velocidad de agitación permite una mayor velocidad de transferencia de oxígeno en el cultivo, acortando la duración de la fase de limitación.

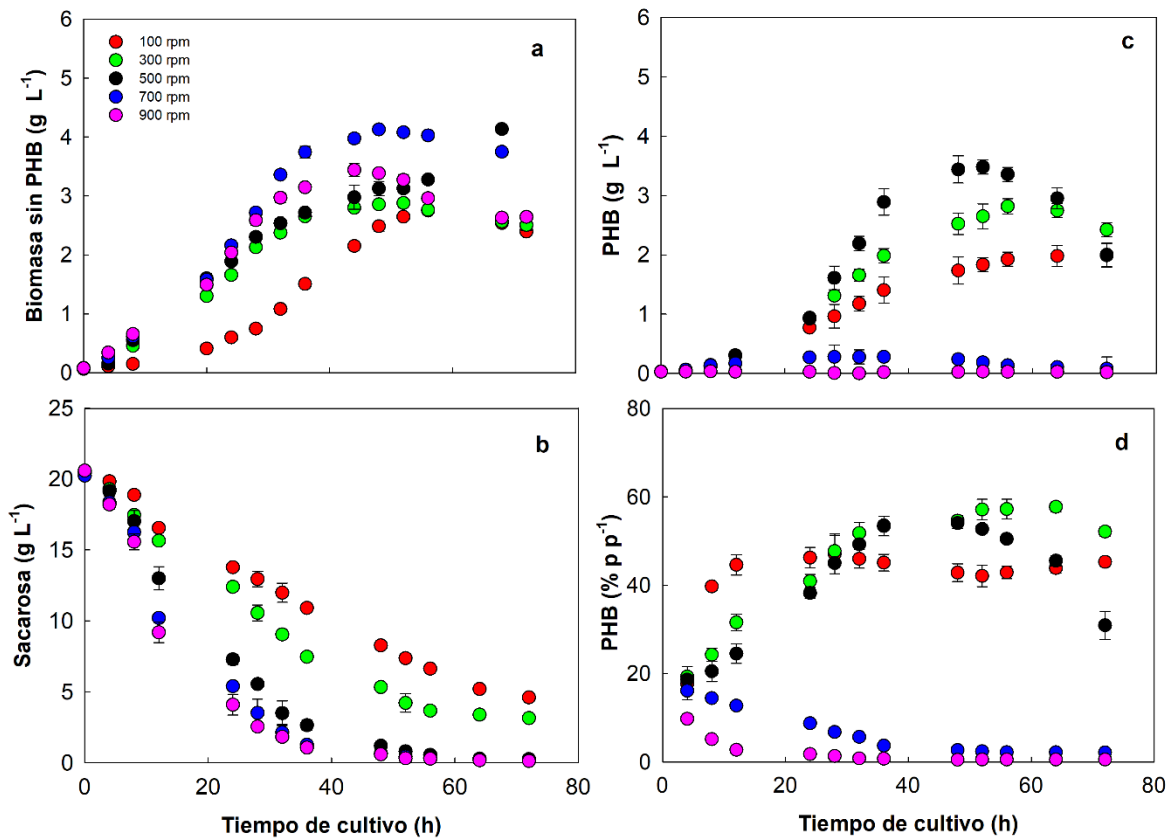


**Figura 7.4** Evolución de la TOD en cultivos por lotes de *A. vinelandii* ATCC 9046 realizados en un biorreactor de 2 L a diferentes velocidades de agitación.

En contraste, en los cultivos a 100 y 300 rpm, el TOD permaneció casi en cero entre 68-70 h, mientras el microorganismo estaba en fase estacionaria. Esta limitación de oxígeno en bajas agitaciones podría deberse a que, incluso en fase estacionaria, las células mantenían altos requerimientos de oxígeno para el mantenimiento celular, superando la capacidad de transferencia de oxígeno del sistema.

La Figura 7.5 muestra la concentración de biomasa sin PHB, la concentración de sacarosa, la producción de PHB en cultivos por lotes de *A. vinelandii* ATCC 9046 a 100, 300, 500, 700 y 900 rpm.

En la Figura 7.5a se muestra que en cultivos realizados a 500 rpm se obtuvo una concentración máxima de biomasa de  $4,6 \pm 0,1 \text{ g L}^{-1}$  (72 h de cultivo), mientras que a 100 y 300 rpm se obtuvieron biomazas más bajas entre  $2,8 \pm 0,1$  y  $2,9 \pm 0,02 \text{ g L}^{-1}$  a las 56 y 52 h de cultivo respectivamente. Por otra parte, se observa que a 700 rpm la concentración máxima de biomasa fue de  $4,1 \pm 0,03 \text{ g L}^{-1}$  a las 48 h, sin embargo, un incremento en la velocidad de agitación a 900 rpm la biomasa decrece a  $3,4 \pm 0,1 \text{ g L}^{-1}$  a las 44 h de cultivo.



**Figura 7.5** Perfil de la biomasa (a), la sacarosa (b) producción de PHB (c) y acumulación de PHB (d) en cultivos por lotes de *A. vinelandii* ATCC 9046 realizados en un biorreactor de 2 L a diferentes velocidades de agitación.

Se han reportado previamente estudios de cultivos por lotes de *A. vinelandii*, a 300, 500 y 700 rpm (Díaz-Barrera et al., 2021; Ponce et al., 2021b). En estos trabajos se observa que, entre 300 y 700 rpm, se alcanzó un máximo de biomasa entre 3,30 y 6,73 g L<sup>-1</sup> aproximadamente, valores superiores a los obtenidos en este trabajo ya que consideraban la biomasa total (con PHB). Cabe destacar que los datos experimentales a 100 y 900 rpm se presentan por primera vez en este trabajo, por lo que no existe evidencia previa reportada sobre los parámetros obtenidos en estas condiciones.

A modo de síntesis, se puede observar que el aumento de la VTO, producto del incremento de la velocidad de agitación, conduce a una mayor concentración de biomasa en fase estacionaria. No obstante, a 900 rpm la biomasa alcanzada en fase estacionaria es menor que a 700 rpm, lo que podría estar asociado a un posible efecto de la hidrodinámica excesiva, evidenciado por la disminución de la biomasa después de las 35 h, lo que podría indicar el inicio de una fase de muerte celular inducida por el estrés mecánico.

En la Figura 7.5b se muestra la evolución de la sacarosa, donde se observó que a 500, 700 y 900 rpm, la sacarosa se consumió totalmente, lo que indica que la fuente de carbono limitó el crecimiento celular. Por otro lado, a 100 y 300 rpm, la concentración de sacarosa no fue consumida completamente, dejando una concentración residual de entre  $2,2 \pm 0,1$  y  $4,6 \pm 0,3 \text{ g L}^{-1}$  aproximadamente a las 72 h de cultivo. Se sabe que en los cultivos de *A. vinelandii* la constante de afinidad ( $K_s$ ) por la sacarosa es de  $0,1 \text{ g L}^{-1}$ , lo que indica que los cultivos a 100 y 300 rpm no estaban limitados por la fuente de carbono (Kuhla & Oelze, 1988b). Para comparar, recientemente se han reportado cultivos por lotes de *A. vinelandii* AT9 a diferentes VTO, 3,6 y 12,4  $\text{mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , y se observó que los cultivos no estaban limitados por la fuente de carbono (Medina et al., 2023).

La Figura 7.5c muestra la producción de PHB bajo las diferentes condiciones estudiadas. En cultivos a 500 rpm se observó una mayor producción de PHB alrededor de  $3,7 \pm 0,1 \text{ g L}^{-1}$  después de 48 h de cultivo, sin embargo, la producción de PHB decrece a  $1,6 \pm 0,1 \text{ g L}^{-1}$  a las 72 h de cultivo lo que sugiere que hay una mayor actividad de despolimerización, esto se correlaciona con el agotamiento de sustrato que se observa a las 48 h (Roohi et al., 2018). La producción de PHB a 300 rpm mostró una evolución que se mantuvo constante con un valor de  $2,9 \pm 0,1 \text{ g L}^{-1}$  a partir de las 36 h de cultivo. Además, a 100 rpm, se obtuvo una producción de PHB cercana a  $2,4 \pm 0,1 \text{ g L}^{-1}$  a las 72 h de cultivo. Finalmente se destaca que la producción de PHB a 700 rpm fue de  $0,4 \pm 0,01 \text{ g L}^{-1}$  a las 28 h de cultivo, luego de eso a las 72 h de cultivo la producción decrece a  $0,02 \pm 0,001 \text{ g L}^{-1}$ . Por otra parte, al aumentar la velocidad de agitación a 900 rpm la producción de PHB sigue disminuyendo y se mantiene constante a lo largo del cultivo a un valor de  $0,03 \pm 0,001 \text{ g L}^{-1}$ . De acuerdo con estos resultados, al incrementar la VTO y por ende la hidrodinámica posee un impacto en la producción de PHB disminuyéndola drásticamente a valores de producción mínimos.

Finalmente, la Figura 7.5d muestra los perfiles obtenidos de acumulación de PHB, destacando que a 100 rpm se obtuvo una acumulación similar a lo largo de todo el cultivo cercana a los  $42,8 \pm 2,0 \text{ \% p p}^{-1}$  a las 64 h de cultivo. A 300 rpm se logró una acumulación máxima de  $52,1 \pm 1,1 \text{ \% p p}^{-1}$  a las 72 h de cultivo. En contraste con estos resultados obtenidos, al aumentar la velocidad de agitación a 500 rpm se observa una acumulación máxima de  $53,5 \pm 0,9 \text{ \% p p}^{-1}$  a las 36 h de cultivo y luego este disminuye a  $31,0 \pm 3,2 \text{ \% p p}^{-1}$  al finalizar el cultivo. Sin embargo, al seguir aumentando la velocidad de agitación a 700 y 900 rpm la acumulación durante el cultivo disminuye considerablemente respecto de la máxima obtenida a 300 rpm en un valor cercano al 80%, lo cual se correlaciona con la producción de PHB.

Los resultados presentados en las figuras 7.5c y 7.5d revelan una clara influencia de la velocidad de agitación, y por ende de la VTO y la hidrodinámica, sobre la producción y acumulación de PHB en *A. vinelandii*. Se observa que, al incrementar la VTO, la producción y acumulación de PHB tienden a disminuir drásticamente, alcanzando valores mínimos a 700 y 900 rpm. Esto sugiere que bajo condiciones de alta disponibilidad de oxígeno y posiblemente un efecto hidrodinámico, *A. vinelandii* desvía su metabolismo de la acumulación de PHB hacia otras vías, como la producción de alginato, o que la propia síntesis de PHB se ve inhibida.

La Tabla 7.2 muestra una comparación de los parámetros de fermentación obtenidos a diferentes velocidades de agitación, de la que se desprende que  $\mu$  se correlaciona positivamente con el aumento de la velocidad de agitación en cultivos de *A. vinelandii* de 0,11 a 0,18 h<sup>-1</sup> entre 100 y 700 rpm, aunque se observa una disminución a 900 rpm, posiblemente por efectos hidrodinámicos (Díaz-Barrera et al., 2021).

**Tabla 7.2.** Parámetros de fermentación ( $\mu$ ,  $q_s$  y  $Y_{X/S}$ ) obtenidos en cultivos por lotes de *A. vinelandii* a diferentes velocidades de agitación

Velocidad de agitación (rpm)	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	$Y_{X/S}$ (g g <sup>-1</sup> )	$q_s$ (g g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
100	0,11 ± 0,01***	0,19 ± 0,01	0,10 ± 0,02**	0,997
300	0,15 ± 0,02*	0,18 ± 0,01	0,11 ± 0,01**	0,990
500	0,16 ± 0,01*	0,22 ± 0,02***	0,15 ± 0,01	0,982
700	0,18 ± 0,01**	0,21 ± 0,01**	0,17 ± 0,01***	0,990
900	0,17 ± 0,02	0,18 ± 0,02	0,17 ± 0,02***	0,985

Los valores corresponden a promedios de tres réplicas independientes ± desviación estándar. Las diferencias entre condiciones fueron evaluadas mediante análisis de varianza unidireccional (ANOVA). Se consideraron estadísticamente significativas según el siguiente criterio: \* P < 0,05 (significativo), \*\* P < 0,01 (muy significativo), \*\*\* P < 0,001 (altamente significativo).

En cuando al  $Y_{X/S}$ , este valor se mantuvo relativamente similar entre las diferentes velocidades de agitación evaluadas. Medina et al., (2023), describió que un aumento en el  $Y_{X/S}$  con la velocidad de agitación podría indicar que la bacteria utiliza mayor proporción del sustrato para crecimiento celular. Sin embargo, velocidades más altas pueden generar una disminución en el rendimiento, dado que el consumo de carbono se destina también a funciones de mantenimiento celular y síntesis de productos como alginato y PHB.

Respecto de nuestros resultados, se observa entre 500 y 700 rpm se encuentran los valores más altos de  $Y_{X/S}$  sugiriendo un mayor aprovechamiento del sustrato para biomasa. En contraste, a 900 rpm el rendimiento vuelve a valores similares a los observados a 100 y 300 rpm, lo que podría indicar un efecto hidrodinámico que afecta la distribución del carbono entre crecimiento y producción de metabolitos secundarios. Por otra parte, en la Tabla 7.2, se observa que la  $q_S$  aumenta con la velocidad de agitación entre 100 y 700 rpm ( $0,10$  a  $0,17$   $g\ g^{-1}\ h^{-1}$ ), lo cual se ha asociado a un incremento en la producción de alginato. Sin embargo, a 900 rpm, el  $q_S$  se mantiene constante, sugiriendo un cambio metabólico en la velocidad de consumo, lo que podría explicarse con la síntesis de productos (Inomura et al., 2017; Lozano et al., 2011; Peña et al., 2000).

La Tabla 7.3 muestra una comparación de los parámetros de fermentación obtenidos a diferentes velocidades de agitación.

**Tabla 7.3.** Parámetros de fermentación ( $Y_{PHB/S}$  y  $Q_{PHB}$ ) obtenidos en cultivos por lotes de *A. vinelandii* a diferentes velocidades de agitación

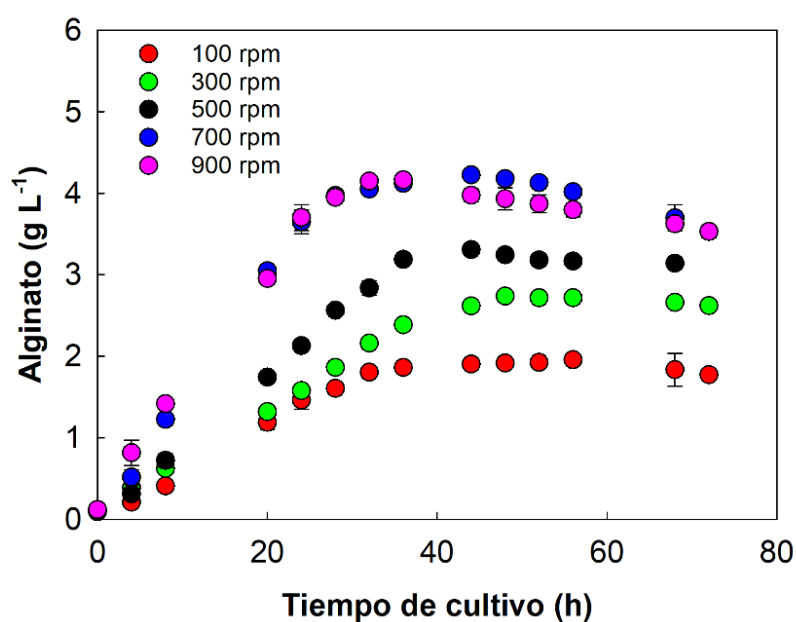
Velocidad de agitación (rpm)	$Y_{PHB/S}$ ( $g\ g^{-1}$ )	$Q_{PHB}$ ( $g\ L^{-1}\ h^{-1}$ )
100	$0,15 \pm 0,01$	$0,03 \pm 0,02$
300	$0,23 \pm 0,01^{**}$	$0,06 \pm 0,02^{**}$
500	$0,18 \pm 0,01$	$0,05 \pm 0,01$
700	$0,06 \pm 0,01^{***}$	$0,01 \pm 0,01^{***}$
900	$0,0013 \pm 0,002^{***}$	$0,001 \pm 0,00^{***}$

Los valores corresponden a promedios de tres réplicas independientes  $\pm$  desviación estándar. Las diferencias entre condiciones fueron evaluadas mediante análisis de varianza unidireccional (ANOVA). Se consideraron estadísticamente significativas según el siguiente criterio: \*  $P < 0,05$  (significativo), \*\*  $P < 0,01$  (muy significativo), \*\*\*  $P < 0,001$  (altamente significativo).

De la Tabla 7.3 se desprende que, entre 100 y 300 rpm, el  $Y_{PHB/S}$  aumenta de  $0,15$  a  $0,23$   $g\ g^{-1}$ , mientras que  $Q_{PHB}$  de  $0,03$  a  $0,06$   $g\ L^{-1}\ h^{-1}$ . No obstante, entre 500 y 900 rpm, ambos parámetros experimentan una disminución, cayendo aproximadamente un 98% respectivamente desde sus valores máximos, lo que sugiere una inhibición casi completa de la síntesis de PHB a velocidades de agitación elevadas.

#### 7.4. Efecto de la VTO sobre la producción de alginato, en cultivos por lotes de *A. vinelandii* ATCC 9046

La Figura 7.6 muestra la concentración de alginato y en cultivos por lotes de *A. vinelandii* realizados a 100, 300, 500, 700 y 900 rpm. En la figura 7.6, se muestra que se obtuvo una concentración máxima de alginato de  $4,2 \pm 0,01 \text{ g L}^{-1}$  (44 h) en los cultivos realizados a 700 rpm. A 900 rpm se obtuvo una concentración similar que a 700 rpm de  $4,2 \pm 0,1 \text{ g L}^{-1}$  a las 36 h de cultivo. Por otra parte, a 500 rpm se obtuvo una concentración de alginato de  $3,3 \pm 0,1 \text{ g L}^{-1}$  a las 48 h de cultivo la cual se mantiene constante hasta el término del cultivo. Entre 100 y 300 rpm se obtuvo una menor concentración de alginato entre  $2,0 \pm 0,02$  a  $2,7 \pm 0,02 \text{ g L}^{-1}$  a las 48 h y a las 56 h de cultivo.



**Figura 7.6** Perfil de la producción de alginato en cultivos por lotes de *A. vinelandii* ATCC 9046 realizados en un biorreactor de 2 L a diferentes velocidades de agitación.

En comparación con estos resultados, se han reportado concentraciones de alginato que oscilan entre  $2,87$  y  $4,17 \text{ g L}^{-1}$ , en cultivos a 300, 500 y 700 rpm, estos se realizaron en condiciones similares a las de este trabajo. Como se puede observar, el aumento de la velocidad de agitación afecta la VTO y ha demostrado ser importante para producir alginato, como varios autores han reportado previamente (Díaz-Barrera et al., 2021; Ponce et al., 2021; Díaz-Barrera, Gutierrez, et al., 2014; Lozano et al., 2011; Peña et al., 2000).

En la Tabla 7.4 se muestra los valores de los parámetros de fermentación sobre la producción de alginato obtenidos bajo las condiciones evaluadas. En cuanto a los valores obtenidos de  $Y_{Alg/S}$ , se observa que a 700 y 900 rpm que es donde se produce la mayor cantidad de alginato alrededor de  $0,30 \text{ g g}^{-1}$  a las 24 h de cultivo. Por otro lado, se muestra que los rendimientos entre 100 y a 500 rpm son muy similares alrededor de  $0,19 \text{ g g}^{-1}$  a las 24 h de cultivo, a lo largo del cultivo estos valores se mantienen constantes decreciendo hasta  $0,14 \text{ g g}^{-1}$ . Se puede concluir que, al aumentar la velocidad de transferencia de oxígeno, el microorganismo desvía mayor cantidad de sacarosa hacia la producción de alginato.

Respecto de  $Y_{Alg/X}$ , se observa en la Tabla 7.4 que un aumento de la velocidad de agitación influye en los valores obtenidos de  $Y_{Alg/X}$ , a 700 y 900 rpm el valor es 30% veces superior al valor más bajo, esto se debe a que hay una mayor producción de alginato en comparación con las otras condiciones, sin embargo, la concentración de biomasa es menor. De acuerdo con lo publicado por otros autores, se han observado valores de  $Y_{Alg/X}$  muy similares para las condiciones de estudio (Día-Barrera et al., 2021; Ponce et al., 2021, Díaz-Barrera et al., 2014). El microorganismo es más activo en la producción de alginato cuando la VTO es mayor, como se muestra, en la figura de la evolución de alginato (Figura 7.6) y en la tabla 7.4, se observa que, tanto la concentración, como la velocidad a la que se obtiene, es la misma a 700 y 900 rpm. Podría ser que, la posibilidad de consumir más oxígeno podría activar la expresión de ciertos genes (enzimas) que facilitan su producción.

**Tabla 7.4.** Parámetros de fermentación ( $Y_{Alg/X}$ ,  $Y_{Alg/S}$ ,  $Q_{Alg}$  y  $q_{Alg}$ ) obtenidos mediante cultivos por lotes de *A. vinelandii* ATCC 9046.

Velocidad de agitación (rpm)	$C_{Alg\text{m}\acute{a}x}$ ( $\text{g L}^{-1}$ )	$Y_{Alg/S}$ ( $\text{g g}^{-1}$ )	$Y_{Alg/X}$ ( $\text{g g}^{-1}$ )	$Q_{Alg}$ ( $\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )	$q_{Alg}$ ( $\text{g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )	Selectividad ( $\text{g}_{Alg} \text{ g}_{Alg+PHB}^{-1}$ )
100	$1,96 \pm 0,02$	$0,70 \pm 0,02$	$0,19 \pm 0,02$	$0,03 \pm 0,02$	$0,02 \pm 0,01$	0,45
300	$2,72 \pm 0,02$	$0,71 \pm 0,02$	$0,19 \pm 0,01$	$0,06 \pm 0,01$	$0,02 \pm 0,01$	0,49
500	$3,33 \pm 0,05$	$0,71 \pm 0,01$	$0,19 \pm 0,03$	$0,07 \pm 0,01$	$0,03 \pm 0,01$	0,50
700	$4,22 \pm 0,01^{***}$	$1,01 \pm 0,01^{**}$	$0,30 \pm 0,01^{**}$	$0,09 \pm 0,02$	$0,04 \pm 0,01$	0,91
900	$4,16 \pm 0,06^{***}$	$1,20 \pm 0,00^{***}$	$0,30 \pm 0,02^{**}$	$0,12 \pm 0,02^{**}$	$0,04 \pm 0,02^{**}$	0,99

Los valores corresponden a promedios de tres réplicas independientes  $\pm$  desviación estándar. Las diferencias entre condiciones fueron evaluadas mediante análisis de varianza unidireccional (ANOVA). Se consideraron estadísticamente significativas según el siguiente criterio: \*  $P < 0,05$  (significativo), \*\*  $P < 0,01$  (muy significativo), \*\*\*  $P < 0,001$  (altamente significativo).

Respecto a los valores de  $Q_p$  en la Tabla 7.4, se observa que a 900 rpm el valor es tres veces mayor con respecto a la condición de agitación más baja. Se sabe que la producción de alginato depende del consumo de sacarosa y de cómo esta ingresa a la vía, generando el ácido polimánurónico el precursor de la biosíntesis. Se cuantificó la  $q_q$  a las diferentes condiciones de cultivo, obteniéndose una productividad específica entre 100 y 300 rpm de  $0,02 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , sin embargo, al aumentar a 900 rpm se observa un valor de  $0,04 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Valores similares fueron reportados por Díaz-Barrera et al., (2021) entre 300 y 700 rpm entre  $0,014$  y  $0,017 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

Por otra parte, para evaluar la eficiencia del proceso en la dirección del flujo metabólico hacia los productos de interés, se calculó el parámetro de selectividad (ver Tabla 7.4), definido como la relación entre los gramos de alginato producidos y la suma de los gramos de alginato más los gramos de PHB. Este parámetro refleja la capacidad de *A. vinelandii* para priorizar una vía biosintética sobre otra bajo diferentes condiciones operativas. Una alta selectividad hacia alginato (valor cercano a 1) señalaría una optimización del proceso para su producción principal, mientras que un valor bajo indicaría una mayor preferencia por la producción de PHB. El análisis de la selectividad mostró que a bajas VTO, se observó que la selectividad hacia el alginato se encontraba en un rango entre 0,45 y 0,49. Este valor indica que una proporción considerable del carbono asimilado por el microorganismo es dirigida hacia la producción de PHB, confirmando que estas condiciones de limitación de oxígeno favorecen la acumulación de este biopolímero de reserva. En contraste, a altas VTO, la selectividad alcanzó valores entre 0,91 y 0,99, lo cual demuestra que el flujo de carbono se orienta predominantemente hacia la producción de alginato. Este hallazgo subraya la capacidad de *A. vinelandii* para optimizar la síntesis de alginato cuando la disponibilidad de oxígeno es elevada.

Particularmente a 500 rpm, la selectividad fue de 0,5. Esto sugiere que, en estas condiciones, el microorganismo se encuentra en una fase metabólica de transición o equilibrio, donde aún existe una producción significativa de PHB, pero la disponibilidad de oxígeno no es lo suficientemente alta como para dirigir el carbono exclusivamente hacia el alginato. Esto podría ser un indicativo crucial de que el metabolismo de *A. vinelandii* puede

ser ajustado y optimizado con precisión, según VTO para favorecer selectivamente la producción de alginato o PHB.

En cuanto a la producción de alginato en términos de la concentración máxima obtenida para cada velocidad de agitación, los resultados muestran una correlación positiva con el incremento de la VTO. Se observa que, a mayor VTO, se produce una concentración mayor de alginato, alcanzando un máximo alrededor de 700 rpm, para luego mantenerse en un nivel similar al aumentar la agitación a 900 rpm. Esto sugiere que el alginato es el producto principal en condiciones de alta disponibilidad de oxígeno, y que la velocidad de agitación favorece su biosíntesis hasta un punto de saturación o incluso por un efecto hidrodinámico.

Sin embargo, más allá de la cantidad producida, es fundamental destacar que la "calidad" del alginato obtenido bajo estas diferentes condiciones de agitación es un factor crítico. La determinación de propiedades y características específicas, como el peso molecular, la viscosidad y la relación G/M, resulta indispensable. Estos serán abordados con mayor detalle en la continuación ya que, permitirán comprender las implicaciones de las condiciones hidrodinámicas en la estructura del alginato y, consecuentemente, determinar en qué condiciones específicas es más ventajoso producir alginato en función de la aplicación final deseada. Es por ello que, dada la complejidad del proceso y la necesidad de una caracterización exhaustiva del alginato para comprender su calidad y propiedades funcionales, se propone la realización de un **estudio estequiométrico**. Este análisis permitirá profundizar en la distribución del flujo de carbono y energía, proporcionando una comprensión más rigurosa de la respuesta de *A. vinelandii* a las condiciones de cultivo y facilitando la obtención del alginato con características específicas.

#### **7.5. Determinación de la ecuación estequiométrica para el crecimiento de *A. vinelandii* ATCC 9046**

A partir de los datos experimentales obtenidos, se propuso el desarrollo de una ecuación estequiométrica de la reacción global para el crecimiento de *A. vinelandii*, aplicable a cada condición de cultivo estudiada. Dado que no existen precedentes reportados para una ecuación de este tipo en la literatura, fue indispensable desarrollar una metodología específica para su formulación.

En primer lugar, para el planteamiento de la reacción, se utilizaron las fórmulas moleculares de todos los compuestos implicados: sacarosa, nitrógeno molecular, oxígeno

molecular, biomasa, alginato, PHB, dióxido de carbono y agua. Siendo necesario la determinación o suposición de las fórmulas moleculares de la biomasa, alginato y PHB.

En el caso de la biomasa, se realizó su determinación experimental mediante un microanálisis elemental de la biomasa obtenida en los diferentes experimentos realizados. En cada punto de muestreo y para cada velocidad de agitación (incluyendo sus réplicas), se analizaron muestras de biomasa para obtener los porcentajes de carbono, hidrógeno y nitrógeno. El porcentaje de oxígeno se determinó por diferencia, asumiendo que el 92% de la composición de la biomasa está formada por los cuatro elementos (C, H, O, N) Con esta información, fue posible calcular la fórmula molecular media de la biomasa en cada tiempo de muestreo y, posteriormente, debido a la pequeña variación observada en cada condición experimental a lo largo del tiempo de fermentación. obtener una fórmula molecular promedio representativa para cada condición experimental (a partir de los triplicados), permitiendo su comparación y uso en la ecuación estequiométrica global (Talaat, 2012; Heldal et al., 1996).

En la Tabla 7.5, se muestra la composición promedio de la biomasa a cada velocidad de agitación refiriendo la composición a 1 mol C / mol biomasa, como es habitual para expresar las fórmulas moleculares representativa de la biomasa.

**Tabla 7.5.** Valores de la composición de biomasa (C, H, O y N) a través de microanálisis elemental para cada velocidad de agitación.

Velocidad de agitación (rpm)	C	H	O	N
100	1	2,65 ± 0,02	0,13 ± 0,02	1,52 ± 0,18
300	1	2,24 ± 0,04	0,12 ± 0,01	1,56 ± 0,06
500	1	1,92 ± 0,02	0,16 ± <0,01	1,33 ± 0,03
700	1	1,95 ± 0,01	0,08 ± <0,01	0,93 ± 0,01
900	1	2,02 ± <0,01	0,16 ± <0,01	1,03 ± <0,01

Los valores corresponden a promedios de tres réplicas independientes ± desviación estándar.

A partir de estos datos, se puede decir, que se muestra que la composición elemental de la biomasa de *A. vinelandii* no es constante, sino que varía significativamente con la velocidad de agitación. Esto valida el realizar el microanálisis en cada condición experimental y en todos los puntos de muestreo, ya que utilizar una fórmula de biomasa genérica podría introducir errores sustanciales en el modelo estequiométrico.

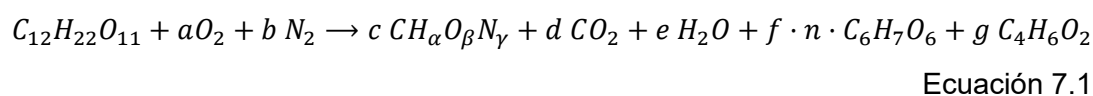
También, se puede observar que a bajas velocidades (100 - 300 rpm), el contenido en N es relativamente alto (1,52-1,56 mol N / mol C), lo que sugiere una biomasa más rica en compuestos nitrogenados (como proteínas y ácidos nucleicos). Sin embargo, a medida que la agitación aumenta, el contenido de nitrógeno disminuye drásticamente, alcanzando sus valores más bajos a 700 y 900 rpm (0,93 y 1,03 mol N / mol C, respectivamente).

Por otra parte, se observaron variaciones en el contenido de H y O. El H tiende a disminuir con la agitación inicial (de 2,65 a 1,92), lo que podría reflejar cambios en la proporción de lípidos o la hidratación de la biomasa. El O presenta fluctuaciones, pero se mantiene en un rango bajo, lo cual es esperable si se asume su determinación por diferencia.

Cabe destacar que es la primera vez que se realiza un microanálisis elemental para el estudio de *A. vinelandii*, por lo que no existe evidencia en literatura. Es por ello que, estos cambios en la composición elemental son un reflejo de las adaptaciones fisiológicas del microorganismo para dirigir su metabolismo hacia la producción de alginato o PHB bajo diferentes VTO.

Por otra parte, para el planteamiento de la reacción, se asignaron fórmulas moleculares tanto al PHB como al alginato. En el caso del PHB, la fórmula molecular empleada en el estudio estequiométrico es:  $C_4H_6O_2$ , obtenida a partir de literatura (Sato et al., 2005). En el caso del alginato, se utilizó la fórmula molecular de sus monómeros, incluyendo en la reacción un coeficiente “n” que considera el número de unidades de las que está formado el alginato en cada condición experimental y que se obtiene a partir de los valores del peso molecular (que se detallan más adelante).

Para el planteamiento de la ecuación estequiométrica, se toma como referencia la fuente de carbono y se introducen los coeficientes en el resto de los compuestos: “a”, para el oxígeno, “b” para la fuente de nitrógeno, “c” para la biomasa”, “d” para el dióxido de carbono, “e” para el agua, “f” para el alginato y “g” para el PHB. Finalmente, la ecuación estequiométrica propuesta es la siguiente (Ecuación 7.1):



Los valores de “f”, “g” y “c” se obtienen a partir de los datos experimentales de  $Y_{X/S}$ ,  $Y_{Alg/S}$  y  $Y_{PHB/S}$  obtenidos a cada velocidad de agitación. Determinando estos valores y aplicando balances elementales y/o balances de electrones (calculando los grados de

reducción de cada compuesto) se determinaron los valores de “a” ( $\text{molO}_2 / \text{molS}_{\text{consumida}}$ ); “b” ( $\text{molN}_2 / \text{molS}_{\text{consumida}}$ ) y “d” ( $\text{molCO}_2 / \text{molS}_{\text{consumida}}$ ). Con esta información se calculó la VCO,  $q\text{O}_2$  y RQ, a cada tiempo de muestreo experimental.

### 7.5.1. Evolución de la VCO, $q\text{O}_2$ y RQ mediante balance estequiométrico durante el crecimiento celular en cultivos por lotes de *A. vinelandii*

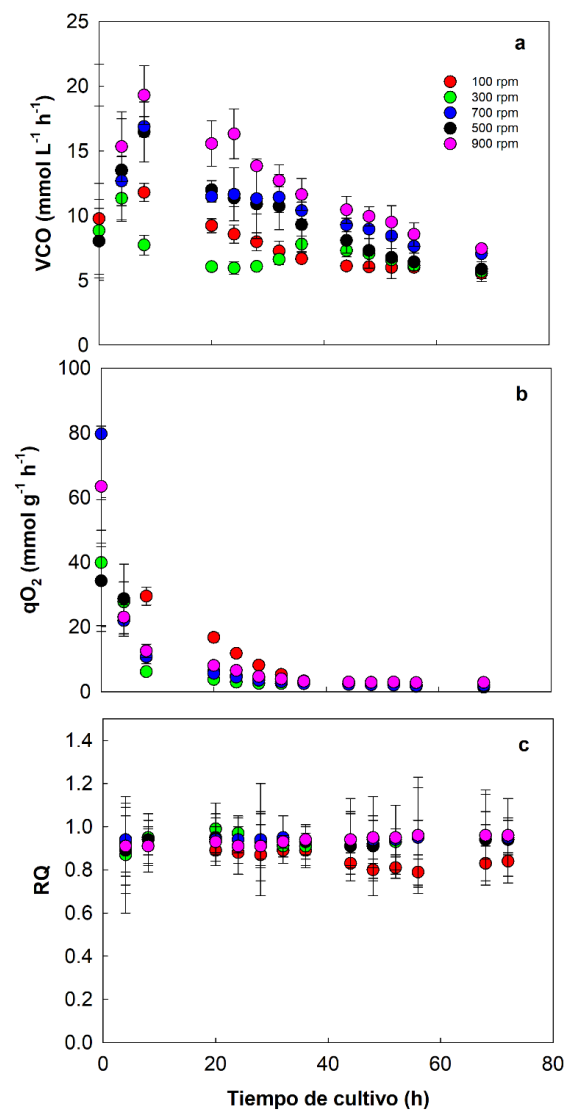
La Figura 7.7 muestra la evolución de la VCO,  $q\text{O}_2$  y RQ durante la fase de crecimiento celular (hasta las 72 h) a diferentes velocidades de agitación. En la figura 7.7a se muestra la evolución de la VCO a lo largo del tiempo determinada a través de balance estequiométrico. En esta figura, se observa que la  $\text{VCO}_{\text{máx}}$  varía para cada condición de cultivo de (entre 100 y 900 rpm), alcanzando valores entre 10 y 27  $\text{mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$  aproximadamente. A medida que avanza el tiempo de cultivo, la VCO tiende a disminuir para todas las condiciones, estabilizándose en valores más bajos (alrededor de 5 - 8  $\text{mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) después de unas 20-30 h. Si bien, a 100 rpm luego de las 36 h de cultivo se puede observar un valor constante de VCO entre  $5,5 \pm 0,4$  y  $6,7 \pm 0,3 \text{ mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$ . A 300 rpm ocurre el mismo fenómeno a partir de las 44 h de cultivo. Sin embargo, entre 500 y 900 rpm, la disminución es progresiva a medida que avanza el cultivo, llegando a valores entre  $5,9 \pm 1,0$  y  $7,4 \pm 0,30 \text{ mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$ , lo que sugiere una fase de menor actividad metabólica o un indicador del término del cese de crecimiento y por ende de la respiración.

La Figura 7.7b muestra la evolución de la  $q\text{O}_2$  a lo largo del tiempo y se puede observar que, durante el crecimiento celular a altas velocidades de agitación (900 rpm) la  $q\text{O}_2$  varió desde  $63,4 \pm 18,4$  hasta  $2,8 \pm 0,2 \text{ mmol g}^{-1} \text{h}^{-1}$  mientras que a bajas velocidades de agitación (100 rpm) el valor de la  $q\text{O}_2$  varió desde  $29,5 \pm 2,8$  hasta  $2,2 \pm 0,2 \text{ mmol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ . El valor más alto de la  $q\text{O}_2$  obtenido a altas velocidades de agitación podría indicar que el flujo de carbono a través del ciclo del ácido tricarbóxico (TCA) se mejoró, como ha informado Castillo et al., (2013).

Un ciclo de TCA más activo podría favorecer la generación de energía, fundamental para la síntesis de precursores de alginato. Una menor concentración de acetil-CoA disponible para la biosíntesis de PHB podría explicar la menor acumulación de PHB en la Figura 7.4 (c y d). Como se observa, existe una clara disminución drástica de la  $q\text{O}_2$  en las primeras horas, cayendo a valores muy bajos después de unas 10 - 20 h de cultivo. La rápida disminución de la  $q\text{O}_2$  sugiere que las células están pasando de una fase metabólica muy

activa a una fase menos activa (estacionaria o de producción), o que se está agotando un nutriente clave que limita su metabolismo.

Respecto del RQ la Figura 7.7c muestra que los valores de RQ se mantiene relativamente constantes alrededor de 0,83 a 0,93 entre las 20 y 40 h de cultivo entre 100 y 900 rpm. sin embargo, entre las 44 y 72 h de cultivo, se observa un aumento del RQ entre 0,91 y 0,96 para las velocidades de agitación entre 300 y 900 rpm. En cambio, a 100 rpm, se observa una disminución del valor alrededor de 0,80. Contrastando estos resultados, Díaz-Barrera et al., (2021) reportaron que utilizando condiciones similares de cultivo a las de este estudio en biorreactor, a diferentes VTO el valor de RQ fue similar a las condiciones evaluadas.

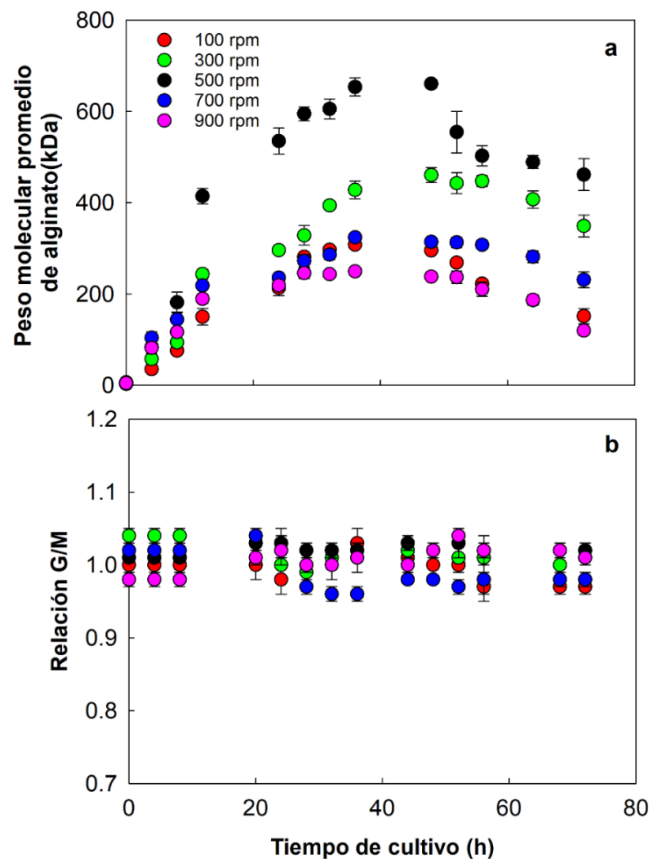


**Figura 7.7** Evolución de la VCO (a), qO<sub>2</sub> (b) y RQ (c) durante el crecimiento celular en cultivos por lotes de *A. vinelandii* ATCC 9046 en un biorreactor de 2 L a diferentes velocidades de agitación.

## 7.6. Influencia de la VTO sobre el PMP, razón G/M, viscosidad y poder viscosificante de alginato en cultivos por lotes de *A. vinelandii*.

Como ya se ha comentado, el alginato se puede utilizar en diferentes aplicaciones y en diferentes industrias, donde el peso molecular, la relación G/M y la longitud del bloque G son factores importantes que determinan las propiedades físicas de los hidrogeles (Augst et al., 2006). Para evaluar la calidad del alginato en términos de peso molecular y relación G/M, se evaluaron los alginatos producidos en los cultivos realizados a diferentes velocidades de agitación que se muestra en la Figura 7.8.

La Figura 7.8a muestra el PMP del alginato obtenido en los diferentes experimentos realizados a lo largo del tiempo de fermentación. En los cultivos desarrollados a 100 rpm, el  $PMP_{\text{máx}}$  del alginato fue de  $308 \pm 12$  kDa (36 h). En los cultivos desarrollados a 300 rpm, el  $PMP_{\text{máx}}$  del alginato fue de  $460 \pm 16$  kDa a las 44 h de cultivo. El  $PMP_{\text{máx}}$  de alginato obtenido entre todas las condiciones fue a 500 rpm con un valor de  $660 \pm 10$  kDa a las 48 h de cultivo, sin embargo, disminuyó a 440 kDa a las 72 h de cultivo. A 700 y 900 rpm el  $PMP_{\text{máx}}$  obtenido fue  $324 \pm 8$  y  $249 \pm 7$  kDa respectivamente. Se puede hacer notar que existe una evolución entre el peso molecular máximo de alginato y al incrementar la velocidad de agitación donde a muy bajas agitaciones como lo es 100 rpm y al incrementar luego de 500 rpm el PMP del alginato disminuye.



**Figura 7.8** Evolución del peso molecular promedio de alginato (a) y razón G/M (b) en cultivos por lotes de *A. vinelandii* ATCC 9046 realizados en un biorreactor de 2 L a diferentes velocidades de agitación.

Respecto de estos resultados se observa una influencia de la VTO en los valores obtenidos, presentando un incremento significativo entre 100 y 500 rpm, sin embargo, en los experimentos realizado a 700 y 900 rpm se obtiene un PMP que disminuye conforme aumenta la VTO.

En todos los cultivos, el  $PMP_{\text{máx}}$  de alginato se obtuvo durante la fase de crecimiento celular, y posteriormente disminuyó (fase preestacionaria). En publicaciones recientes, se observó que, en cultivos por lotes a 500 rpm, la PMP del alginato disminuyó de 607 a 385 kDa entre las 40 y 48 h de cultivo. La disminución del PMP de alginato durante el cultivo puede explicarse por la acción de las alginato liasas (Ponce et al., 2021; Flores et al., 2013; Trujillo-Roldán, et al., 2004) codificadas por seis genes de alginato liasa en *A. vinelandii* (Gimmestad et al., 2009). Sin embargo, en esas condiciones de transferencia de oxígeno se produzca desde el inicio alguna enzima que no permita que el alginato obtenido sea capaz de alcanzar pesos moleculares elevados las cuales serán analizadas más adelante.

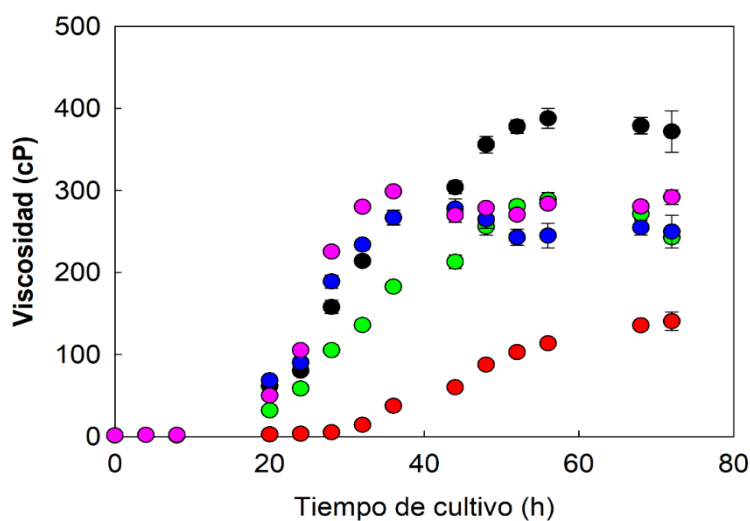
La Figura 7.8b presenta la relación G/M del alginato a diferentes velocidades de agitación, se observa que la evolución de estos valores durante el tiempo de cultivo no dependió de la velocidad de agitación. En los cultivos desarrollados a 100 rpm, la relación G/M tuvo una mayor variación a lo largo del cultivo, varió de  $0,99 \pm 0,01$  a  $1,02 \pm 0,02$  (8 h a 36 h de cultivo) y luego disminuyó a  $0,97 \pm 0,20$  (72 h de cultivo), Bajo esta condición, los valores de la relación G/M mostraron una desviación estándar mayor, lo que podría indicar la más amplia variedad de distribución de monómeros, condición que fue observada previamente por Reynoso-Cereceda et al., (2018).

En cultivos desarrollados a 300 rpm se observa una evolución que se mantuvo constante a lo largo del cultivo que disminuyó de  $1,04 \pm 0,01$  a  $1,01 \pm 0,001$  (8 h a 72 h de cultivo). En cultivos desarrollados a 500 rpm los valores de la relación G/M se mantuvieron similares a lo largo del cultivo  $1,01 \pm 0,001$  (entre las 8 h y 72 h de cultivo). A 700 rpm se obtuvo una evolución que aumentó durante las primeras 20 h de  $1,02 \pm 0,01$  a  $1,04 \pm 0,01$  y luego este valor disminuye a  $0,98 \pm 0,01$  (entre las 24 y las 72 h de cultivo). Bajo esta condición el alginato fue sintetizado completamente en la fase de crecimiento celular (Figura 7.6c) y es posible que la disminución en la relación G/M observada pueda deberse debido a la acción de epimerasas. Se sabe que AlgE1-7 es una enzima bifuncional con actividades de alginasa y epimerasa C-5 (Svanem et al., 2001). Las liasas catalizan una  $\beta$ -eliminación del enlace 4- O -glicosídico, generando un residuo de 4-desoxi-leritro-hex-4-enopiranosiluuronato (Svanem et al., 2001), que disminuye el contenido de G en la estructura del alginato. A 900 rpm se observa que, la relación G/M fue similar (aproximadamente 1,01) durante todos los tiempos de cultivo.

Respecto de estudios sobre la relación G/M de alginato producido en cultivos de *A. vinelandii* son bastante limitados (Bonartseva et al., 2017; Díaz-Barrera et al., 2021; Gaytán et al., 2012). Díaz-Barrera et al., (2021) utilizando *A. vinelandii* ATCC 9046, determinaron la relación G/M en cultivos a 3 L a diferentes VTO en condiciones diazotróficas. En los cultivos realizados a una VTO de  $10,4 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (500 rpm), la G/M aumentó durante la fase de crecimiento celular y disminuyó durante la fase estacionaria; mientras que, en los cultivos,  $19,2 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (700 rpm) fue constante durante todo el cultivo. Se obtuvo una mayor relación G/M ( $0,86 \pm 0,01$ ) en los cultivos realizados a  $10,4 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Gaytán et al., (2012), utilizando la bacteria ATCN4 mutante de *A. vinelandii* (carece de actividad  $\text{Na}^+$ -NQR) en matraces de agitación, demostró que la relación G/M se vio afectada por las condiciones nutricionales, obteniendo un G/M de 4,5 en un medio de cultivo que contenía extracto de levadura. Para obtener alginatos con mayores relaciones G/M y bajo nuestras condiciones

experimentales, es posible evaluar el crecimiento celular y la producción de alginato en un medio de cultivo que impida la fijación de nitrógeno.

Otro parámetro importante de determinar es la viscosidad del alginato. Los resultados referentes a la viscosidad del alginato, presentados en la Figura 7.9, demuestran la influencia de la VTO sobre esta propiedad reológica del alginato. Las viscosidades más altas se obtuvieron a 500 rpm, alcanzando un valor máximo de 388 cP a las 56 horas, el cual se mantuvo constante hasta el final del cultivo. En contraste, los valores más bajos de viscosidad se registraron a 100 rpm, con un máximo de 141 cP. Por otro lado, los cultivos a 300, 700 y 900 rpm exhibieron valores de viscosidad similares, oscilando entre 250 y 292 cP. La principal diferencia entre estos últimos radica en el tiempo en que se alcanzó la máxima viscosidad: aproximadamente a las 36 horas para 700 y 900 rpm, y hacia el tiempo final del cultivo para 300 rpm.

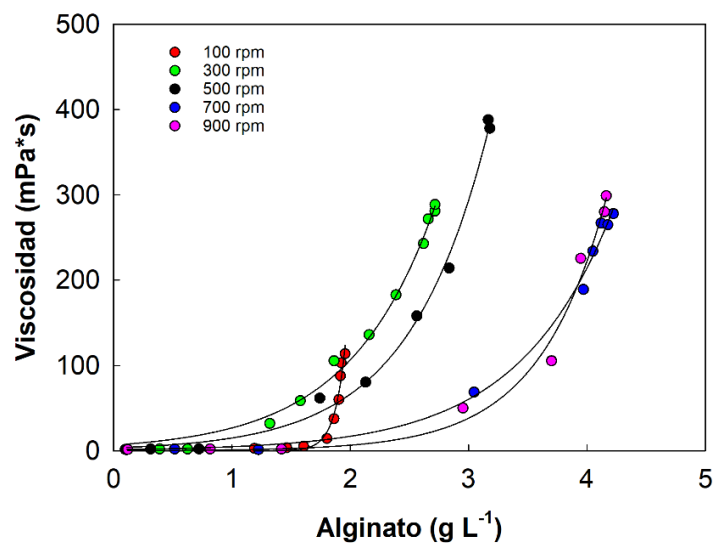


**Figura 7.9** Evolución de la viscosidad en cultivos por lotes de *A. vinelandii* ATCC 9046 realizados en un biorreactor de 2 L a diferentes velocidades de agitación.

En general, la viscosidad del alginato no presentó un aumento significativo hasta las 30 horas de fermentación en los cultivos a 100 rpm, mientras que en el resto de los experimentos esta tendencia se observó desde las 20 horas. El incremento de la viscosidad hasta las 40 horas es coherente con el aumento de la concentración de alginato y el peso molecular del polímero producido en las diferentes agitaciones estudiadas. Se cree que la viscosidad tiene una relación directa con la concentración y el peso molecular del alginato obtenido, y nuestros datos lo corroboran en gran medida, evidenciando cómo la VTO impacta directamente en las características del biopolímero.

Se conoce que los alginatos son comercialmente importantes debido a su capacidad como agentes viscosificantes en diversas industrias, por lo que su calidad depende de su poder viscosificante, que puede definirse como la relación entre la concentración de alginato y la viscosidad que presenta (Peña et al., 2010).

En la Figura 7.10 se observa una relación entre la concentración y la viscosidad del alginato a diferentes velocidades de agitación (100, 300, 500, 700 y 900 rpm) en los diferentes tiempos del cultivo. Para todas las condiciones evaluadas, se encontró una relación exponencial entre la viscosidad y la concentración de alginato, lo que indica que, al aumentar la concentración de alginato, la viscosidad también aumenta, y de forma no lineal (más fuerte con concentraciones mayores). Los datos de la Figura 7.10 se ajustaron a la Ecuación 5.17, que corresponde a un modelo exponencial, utilizando los valores experimentales obtenidos a cada tiempo de cultivo con sus respectivas réplicas.



**Figura 7.10** Perfil de poder viscosificante en cultivos por lotes de *A. vinelandii* ATCC 9046 realizados en un biorreactor de 2 L a diferentes velocidades de agitación.

Los parámetros derivados del ajuste estadístico para cada velocidad de agitación se presentan en la Tabla 7.6.

**Tabla 7.6.** Poder viscosificante del alginato en cultivos por lotes de *A. vinelandii* a diferentes velocidades de agitación

Velocidad de agitación (rpm)	<i>a</i>	<i>b</i>	R <sup>2</sup>
100	2,10 ± 0,2	2,03 ± 0,04	0,9910
300	1,06 ± 0,1	2,16 ± 0,2	0,9905
500	1,11 ± 0,04	1,91 ± 0,3	0,9876
700	0,74 ± 0,1	1,40 ± 0,1	0,9924
900	0,70 ± 0,3	1,43 ± 0,2	0,9820

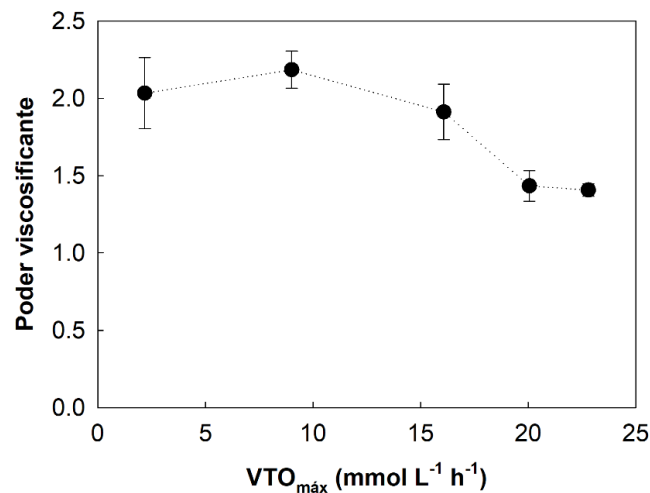
Los valores corresponden a promedios de tres réplicas independientes ± desviación estándar.

La Tabla 7.6 presenta los parámetros obtenidos del ajuste exponencial entre la concentración del alginato y la viscosidad de la solución. El parámetro *a* representa el valor estimado de la viscosidad inicial o base del sistema, es decir, la viscosidad teórica cuando la concentración del polímero tiende a cero. Por su parte, el parámetro *b* describe la velocidad de incremento exponencial de la viscosidad en función de la concentración, y se interpreta como un indicador del poder viscosificante del biopolímero: a mayor valor de *b* mayor es el efecto espesante que ejerce el polímero al aumentar su concentración. El poder viscosificante del alginato obtenido durante todo el cultivo es mayor a bajas velocidades de agitación (100 - 500 rpm), donde pequeñas concentraciones del polímero generan aumentos significativos en la viscosidad. A velocidades superiores a 500 rpm, este efecto se reduce considerablemente, lo cual podría atribuirse a la disrupción mecánica de la red polimérica como consecuencia del aumento en las fuerzas de corte.

Este comportamiento podría estar relacionado con los cambios en la hidrodinámica del sistema dentro del biorreactor, donde un mayor cizallamiento podría favorecer la fragmentación de las cadenas de alginato o interferir con su correcta polimerización, afectando así su estructura y peso molecular, y disminuyendo su capacidad para generar viscosidad. Para establecer una relación más directa entre la capacidad viscosificante del alginato y las condiciones de cultivo, se relacionó el valor del poder viscosificante de cada curva con la VTO<sub>máx</sub> obtenida en los cultivos de *A. vinelandii* bajo las mismas condiciones de cultivo. En la Figura 7.11 se muestra esta relación y se puede observar cómo el rendimiento del biopolímero, en términos de su capacidad de aumentar la viscosidad, se ve influenciado por el régimen hidrodinámico del cultivo.

En la Figura 7.11 se observa que el valor del poder viscosificante tiene una evolución que va disminuyendo a medida que aumenta la VTO<sub>máx</sub> de 2,2 a 22,8 mmol L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. A baja VTO<sub>máx</sub> (entre 5 - 15 mmol L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) el valor de la pendiente es alto lo que indica un mayor poder viscosificante del alginato. A mayores VTO<sub>máx</sub> (por sobre 15 mmol L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) el valor de la

pendiente disminuye (cercano a 1.4), lo que sugiere que el alginato tiene menor calidad viscosificante. Se puede concluir que la tendencia claramente descendente a partir de cierto valor de  $VTO_{m\acute{a}x}$  ( $15 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ), lo que podría implicar un efecto negativo de la hidrodinámica con mayor disponibilidad del oxígeno afectando la calidad del polímero.



**Figura 7.11** Relación entre el exponente del poder viscosificante y  $VTO_{m\acute{a}x}$  en cultivos por lotes de *A. vinelandii* ATCC 9046 realizados en un biorreactor de 2 L a diferentes velocidades de agitación.

Peña et al. (2011) evaluaron la capacidad viscosificante del alginato en cultivos de *A. vinelandii* realizados en matraces agitados a distintas velocidades. Observaron una relación exponencial entre viscosidad y concentración. A menor  $VTO_{m\acute{a}x}$ , se obtuvo una mayor viscosidad específica. Ellos sugieren que en condiciones transferencia de oxígeno menores favorece la producción de alginatos con mejor capacidad viscosificante. Por otra parte, Gómez-Pazarín et al., (2016) observó que volúmenes más bajos y mayores velocidades de agitación (100 mL a 200 rpm) favorecen un mayor poder viscosificante, mientras que al aumentar el volumen o disminuir la agitación (300 mL a 125 rpm) se reduce la capacidad viscosificante del caldo. Esto demuestra que la calidad del alginato producido depende significativamente de las condiciones hidrodinámicas del cultivo.

Por otra parte, al relacionar el poder viscosificante con el PMP y la razón G/M de alginato, en la figura 7.8a, se muestra que, los cultivos realizados a entre 300 y 500 rpm produjeron alginatos con PMP mayores, lo cual coincide con un mayor poder viscosificante observado (Figura 7.11). Esta relación puede explicarse debido a que polímeros de mayor peso molecular incrementan la viscosidad del medio con mayor eficiencia, ya que presentan mayores interacciones entre cadenas y mayor capacidad para formar redes tridimensionales (Medina et al., 2023; García et al., 2020; Gómez-Pazarín et al., 2016b; Peña C et al., 2011).

Por otro lado, la razón G/M también es importante cuando se analiza la calidad de alginato, pero en este estudio se observó que esta relación se mantuvo relativamente constante a lo largo del tiempo y entre condiciones de agitación (Figura 7.7b). Esto sugiere que, bajo las condiciones estudiadas, la variación en el poder viscosificante está más influida por el PMP que por la composición G/M.

## **7.7. Evaluación de la respiración mediante cambios en la velocidad de agitación en cultivos por lotes de *A. vinelandii***

Con el fin de comprender cómo las condiciones de operación influyen en la respiración celular de *A. vinelandii* durante cultivos por lotes, se evaluó el impacto de la velocidad de agitación sobre parámetros asociados a la transferencia de oxígeno. Para ello, se hizo necesario desarrollar una correlación empírica que permitiera estimar  $k_L a$  en el sistema de cultivo utilizado, lo cual se detalla a continuación. Para determinar cómo la  $qO_2$  influye en la producción de alginato a diferentes VTO mediante el cambio de la velocidad de agitación, se desarrolló una correlación empírica del  $k_L a$ .

### **7.7.1. Desarrollo de una correlación empírica tipo modelo potencial para la estimación del $k_L a$ en un biorreactor tanque agitado**

Se trata de obtener a partir de datos experimentales los parámetros que relacionen los valores de  $k_L a$  con las variables estudiadas o influyentes en el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno, según la Ecuación 7.2.

$$k_L a = C \cdot V_S^\alpha \cdot N^\beta \cdot \mu_A^\gamma \quad \text{Ecuación 7.2}$$

Para la obtención de la correlación empírica, en primer lugar, se utilizó el alginato producido a 500 rpm para simular las condiciones de viscosidad del caldo de cultivo, el cual fue precipitado, secado y posteriormente disuelto en agua. Esta solución de alginato se diluyó progresivamente con medio de cultivo en condiciones donde se modificaban la velocidad de agitación, el flujo de aireación y, consecuentemente, la viscosidad del sistema.

Posterior a eso, se desarrollaron una serie de experimentos mostrados en el Anexo 6, donde se determinaron los parámetros  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  mediante regresiones lineales simples aislando cada variable, lo que sirvió para descartar algunos experimentos que no se

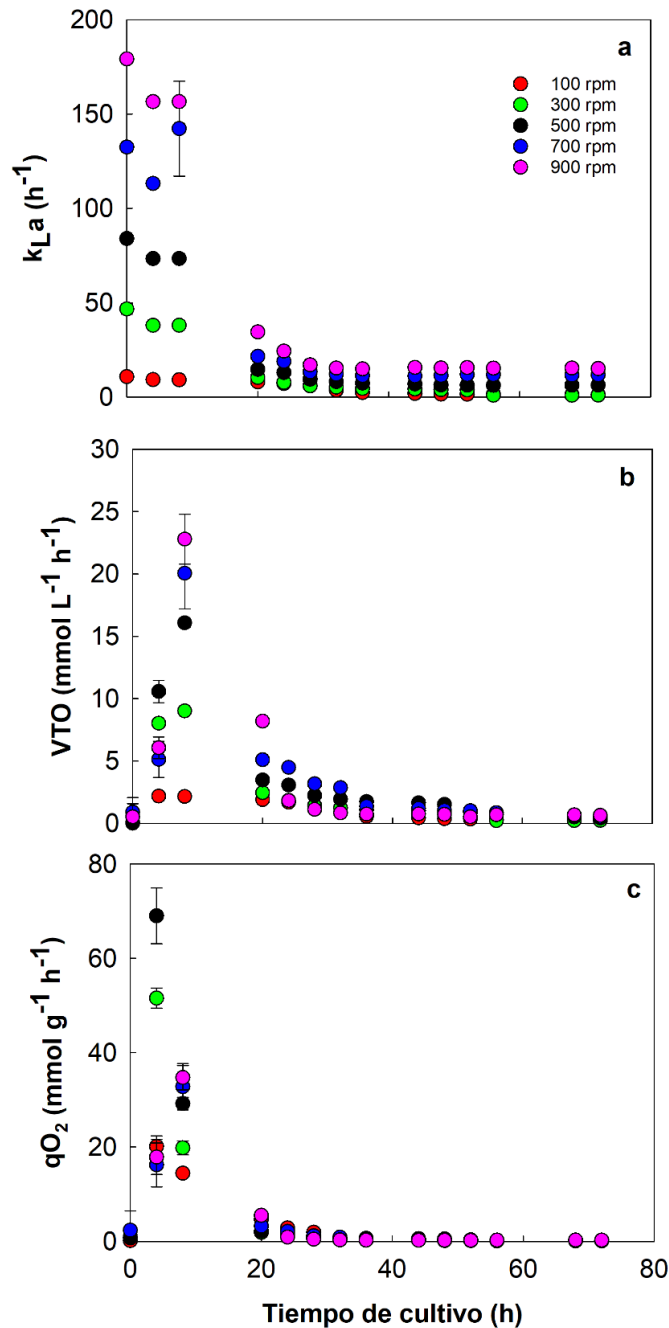
encontraban en la tendencia general. Posteriormente, utilizando el programa OriginPro 2021, se obtuvo la correlación empírica definitiva a través de una regresión lineal múltiple para obtener los coeficientes finales de la correlación empírica del  $k_L a$  mostrados en la Ecuación 7.3 y que se detallan en la Tabla 7.7

$$k_L a = 1,36 \cdot 10^{-3} \cdot V_S^{0,47} \cdot N^{1,29} \cdot \mu_A^{-0,47} \quad \text{Ecuación 7.3}$$

Luego de obtener la correlación empírica de  $k_L a$ , se procedió a calcular algunos parámetros de respiración en cada tiempo de cultivo los cuales se muestran en la Figura 7.12, utilizando los valores de viscosidad previamente mostrados en la Figura 7.9, ya que este parámetro influye directamente en la VTO y en la  $qO_2$ .

**Tabla 7.7.** Parámetros de la correlación empírica obtenidos por regresión lineal múltiple.

Parámetro	Valor	
	Experimental	Reportado
A	0,47 ± 0,02	0,3 - 0,7
B	1,29 ± 0,01	0,8 – 2
Γ	-0,47 ± 0,02	(-1) - (- 0,4)



**Figura 7.12** Evolución del  $k_{La}$ , VTO y  $qO_2$  en cultivos por lotes de *A. vinelandii* ATCC 9046 realizados en un biorreactor de 2 L a diferentes velocidades de agitación.

En la Figura 7.12a se muestra el perfil de  $k_{La}$  obtenido a través de una correlación empírica que se ha desglosado en la sección 5.4.7 incluyendo la viscosidad a cada tiempo de muestreo con el fin de mostrar cómo se ve influenciado por la viscosidad y el cambio de agitación. En esta figura se puede observar que el  $k_{La}$  más alto se obtiene a 900 rpm con un valor de  $160 h^{-1}$ , luego a 700 rpm con un valor de  $140 h^{-1}$ , a medida que se disminuye la velocidad de agitación de 500 a 100 rpm el  $k_{La}$  disminuye de 80 a  $9,1 h^{-1}$ . Se destaca que los

valores altos de  $k_L a$  solo se obtienen durante las primeras 8 h de cultivo que es donde la viscosidad es muy baja cercana a la del agua. Luego a medida que el cultivo sigue su transcurso los valores de  $k_L a$  se mantienen constantes desde las 28 h hasta las 72 h en un rango entre 0,8 y 15,3 h<sup>-1</sup>.

En la Figura 7.12b se observa el perfil de VTO calculado para cada tiempo de muestreo (Sección 5.4). Se conoce que aumento de la velocidad de agitación de 100 a 900 rpm incrementa la  $VTO_{\text{máx}}$  de 2,15 a 22,7 mmol L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> a las 8 h de cultivo, estos valores no permanecen constante a lo largo del tiempo, sino que decrecen y se mantienen constantes al final del cultivo. Al comparar estos datos, con otras publicaciones de nuestro grupo podemos observar, el perfil típico de VTO en *A. vinelandii* en cultivos por lotes se caracteriza por el máximo valor sostenido durante el periodo de crecimiento celular ( $VTO_{\text{máx}}$ ), este cálculo se realiza por balance de gases en el sistema. Se ha reportado que cultivos con limitación de oxígeno poseen ese perfil de VTO característico. En este caso al ser calculado por otra ecuación matemática considerando el cambio de viscosidad y de  $k_L a$  el perfil no es muy similar. Sin embargo, cabe destacar que se han reportado valores de VTO al aumentar la agitación de 300 a 700 rpm de 5,0 a 19,2 mmol L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> los cuales coinciden con nuestros datos de VTO máximos a esas agitaciones.

La Figura 7.12c muestra la evolución de la  $qO_2$  a lo largo del cultivo, donde se observa que los valores más altos se obtienen en los primeros tiempos de cultivos, y luego disminuye desde las 24 h hasta las 72 h de cultivo. Se muestra que el cultivo realizado a una VTO de 2,12 mmol L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> el  $qO_2$  máximo fue de 20,1 mmol g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, mientras que los cultivos realizados a una VTO de 23,8 mmol L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> el  $qO_2$  máximo fue de 35 mmol g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Se sabe que en condiciones de limitación de oxígeno la disminución del  $qO_2$  después de alcanzar el valor máximo se debe a que la VTO cambia por aumento de la viscosidad modificando el  $k_L a$  y porque la biomasa va en aumento.

Respecto de los datos de  $qO_2$  obtenido mediante el modelo estequiométrico respecto de los obtenidos utilizando el modelo empírico de  $k_L a$  y la viscosidad del cultivo, se puede observar que, hay diferencias durante las primeras 24 h de cultivo. El modelo empírico presentó valores significativamente más altos de  $qO_2$  en condiciones entre 500 y 900 rpm, con sobreestimaciones relativas superiores al 50 % respecto del modelo estequiométrico entre 4 y 16 h de cultivo. Esta sobrestimación podría deberse a la mayor sensibilidad del modelo empírico a las condiciones hidrodinámicas locales y a la influencia de la viscosidad en la transferencia de oxígeno.

En contraste, el modelo estequiométrico mostró estimaciones más estables a lo largo del tiempo. A partir de las 28 h, los valores del modelo empírico fueron menores con respecto del modelo estequiométrico. Estos resultados podrían indicar que, cada modelo tiene una fase más adecuada donde existe un ajuste mejor, el modelo empírico podría ser más adecuado para fases tempranas de cultivo, mientras que el modelo estequiométrico resulta más adecuado en la fase estacionaria o cuando hay actividad metabólica.

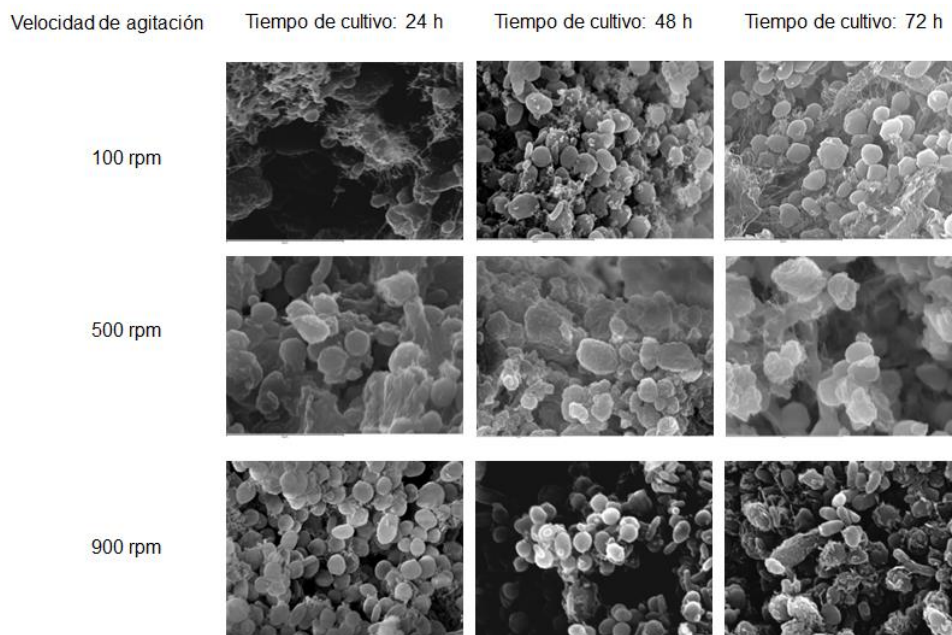
Al relacionar los datos obtenidos en los cultivos por lotes de *A. vinelandii*, el  $k_La$  y la VTO, se ven afectados por el aumento de la viscosidad del medio a causa de la producción de alginato. Esta viscosidad podría reducir transferencia de oxígeno al dificultar la formación y dispersión de burbujas finas, disminuyendo así el área interfacial disponible para la difusión gaseosa. Como resultado, el  $k_La$  disminuye en el tiempo, lo que impacta directamente la VTO y, con ello, la disponibilidad de oxígeno disuelto para el metabolismo celular. Esto tiene una consecuencia en la calidad del alginato, en el PMP, viscosidad y poder viscosificante del alginato. Se ha observado a un  $k_La$  entre 40 - 80 h<sup>-1</sup> y una VTO entre 7 - 15 mmol L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> favorecen la biosíntesis de alginato de mayor peso molecular. Esta condición favorece una polimerización y la expresión de enzimas implicadas como las epimerasas, y una menor actividad de alginato liasas, responsables de la degradación del polímero en comparación a altas velocidades de agitación. Dado esto, un mayor peso molecular del alginato se traduce directamente en mayores valores de viscosidad en solución, y a su vez, un mayor poder viscosificante. En este contexto, la VTO, entre 7 - 15 mmol L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, favorece la calidad del alginato.

En contraste, cuando la velocidad de agitación está por sobre un valor de  $k_La > 90$  h<sup>-1</sup>, puede producirse un estrés oxidativo o mecánico que induce la expresión de enzimas degradativas, reduciendo el peso molecular del alginato y, por tanto, su viscosidad y poder viscosificante, sin embargo, un efecto positivo en la producción de alginato. De forma inversa, a una baja velocidad de agitación ( $k_La < 15$  h<sup>-1</sup>), hay una limitación de oxígeno, que disminuye la  $qO_2$  y esto podría afectar la biosíntesis del alginato resultando biopolímeros de menor calidad. Por lo tanto, si se desea establecer una relación directa entre las condiciones de transferencia de oxígeno, la viscosidad del medio y la calidad del alginato: el equilibrio entre velocidad, flujo de aireación y viscosidad es clave para obtener un polímero con alto peso molecular, viscosidad elevada y excelente capacidad viscosificante, atributos fundamentales para su aplicación en sectores como farmacéutica, cosmética o biomedicina.

## 7.8. Influencia de la VTO sobre la morfología celular en cultivos por lotes de *A. vinelandii*

La morfología celular de *A. vinelandii* puede verse significativamente influenciada por las condiciones de cultivo, entre las cuales la velocidad de agitación podría desempeñar un papel determinante. Analizar los cambios morfológicos bajo diferentes regímenes de velocidad de agitación permite comprender la respuesta fisiológica del microorganismo para optimizar las condiciones para la producción de biopolímeros de interés industrial y biomédico.

A continuación, en la Figura 7.13 se presenta análisis descriptivo de la morfología celular de *Azotobacter vinelandii* bajo diferentes velocidades de agitación (100, 500 y 900 rpm) y tiempos de cultivo (24, 48 y 72 h), basado en las micrografías obtenidas por SEM.



**Figura 7.13** Micrografía de SEM de células de *A. vinelandii* a diferentes tiempos de cultivo (8, 24 y 72 h) y a diferentes velocidades de agitación. Todas las imágenes fueron realizadas con un aumento original de 7000X y la barra de escala representa 8  $\mu\text{m}$ .

De la Figura 7.13 se desprende que, existe una influencia de la velocidad de agitación sobre la morfología celular y la estructura del alginato en cultivos por lotes de *A. vinelandii*. A 100 rpm, las células se observan pequeñas y compactas durante todo el cultivo (24, 48 y 72 h), con una organización más densa. La baja velocidad de agitación genera condiciones de limitación de oxígeno, favoreciendo la formación de cápsulas finas y biopelículas, pero

restringiendo el crecimiento celular. A 500 rpm, se observan células visiblemente más grandes y con formas parcialmente deformadas, especialmente a partir de las 48 h. Esta deformación celular parece asociada a una mayor producción de alginato, el cual se observa adhiriéndose fuertemente a la superficie de la célula. El aumento en la viscosidad podría estar promoviendo esta morfología.

En contraste, a 900 rpm se observa una morfología inicialmente redondeada, pero con una reducción progresiva del tamaño celular conforme avanza el cultivo. Además, las células se ven más deformadas y dispersas, posiblemente debido al cizallamiento, que no solo compromete la calidad del alginato extracelular, sino que también puede inducir estrés morfológico y daño mecánico. La baja cohesión de la matriz sugiere una menor retención de exopolisacárido en la superficie celular, lo que afecta tanto la organización estructural como la funcionalidad del biopolímero producido.

De acuerdo con estos resultados, se ha reportado que las altas velocidades de agitación en biorreactores de tanque agitado pueden provocar cambios en el tamaño o la morfología celular (Acedos et al., 2019; Trujillo-Roldán & Valdez-Cruz, 2006; Barbosa et al., 2003). Acedos et al., (2019) reportó un estudio de cultivos de *Shimwellia blattae* (p424IbPSO) bajo diferentes condiciones fluidodinámicas. Se realizaron experimentos en un biorreactor tanque agitado cambiando la velocidad del agitador de 100 a 1200 rpm mostrando que el estrés hidrodinámico aparece en experimentos realizados entre 1000 y 1200 rpm. Los resultados indicaron que la disponibilidad de oxígeno tiene una gran influencia porque la distribución de metabolitos cambia claramente en experimentos realizados en condiciones en las que aún no aparece el estrés hidrodinámico, pero aumentado la VTO.

En la Tabla 7.8. se presenta el diámetro de células de *A. vinelandii* cultivadas a diferentes velocidades de agitación, el cual fue determinado a partir de imágenes de SEM.

**Tabla 7.8.** Diámetro de células de *A. vinelandii* en cultivos por lotes a diferentes velocidades de agitación mediante SEM.

Velocidad de agitación (rpm)	Tiempo de cultivo (h)	Diámetro (µm)
100	24	1,28 ± 0,12
	48	1,35 ± 0,18
	72	1,36 ± 0,23

500	24	1,32 ± 0,24
	48	1,77 ± 0,24
	72	2,07 ± 0,14
900	24	1,29 ± 0,21
	48	1,10 ± 0,28
	72	0,98 ± 0,09

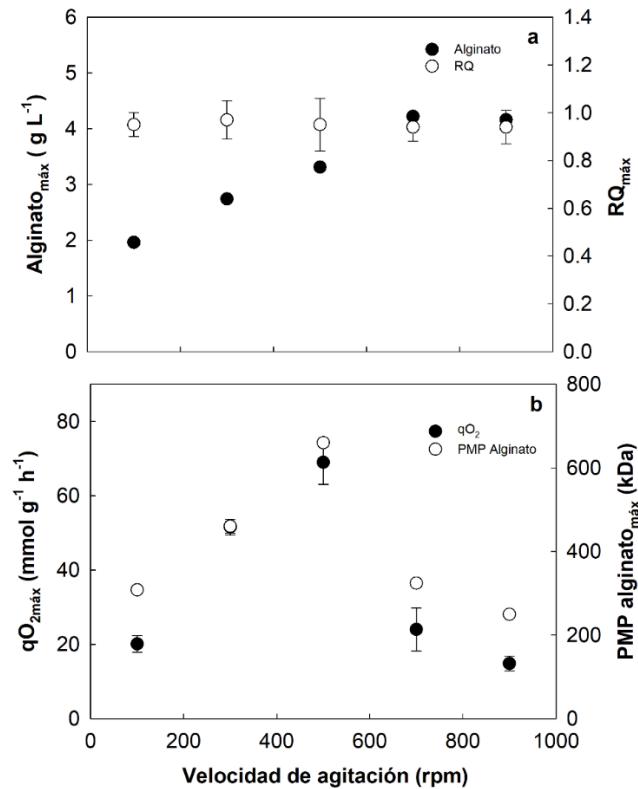
Los valores corresponden a promedios de tres réplicas independientes ± desviación estándar.

De la Tabla 7.8 se desprende que, a 100 rpm, el diámetro celular permanece relativamente constante en el rango de 1,28 a 1,36  $\mu\text{m}$ , lo que sugiere un estado fisiológico estable. A 500 rpm, se observa un incremento progresivo del diámetro celular a lo largo del tiempo, alcanzando un máximo de  $2,07 \pm 0,14 \mu\text{m}$  a las 72 horas. Este incremento morfológico se podría asociar a una mayor producción de alginato, que se adhiere a la superficie celular, generando una envoltura más espesa y una apariencia celular más grande y deformada bajo SEM. A 900 rpm, se detecta una disminución progresiva del diámetro celular con el tiempo, desde  $1,29 \pm 0,21 \mu\text{m}$  (24 h) hasta  $0,98 \pm 0,09 \mu\text{m}$  (72 h). Esto sugiere que las condiciones de alta hidrodinámica o cizallamiento afecta el tamaño de la célula. Las células tienden a una morfología más reducida y deformada.

Estos hallazgos confirman que la VTO también modula la forma y tamaño celular, así como la interacción física entre el alginato y la célula. Por lo tanto, entender esta dinámica es clave para optimizar el diseño de bioprocesos dirigidos a la producción de alginatos con características específicas, especialmente en aplicaciones biomédicas donde la viscosidad, peso molecular y capacidad de gelificación son críticas.

## 7.9. Relación entre la respiración y la producción de alginato bacteriano

La respiración de *A. vinelandii* juega un rol clave en la síntesis de alginato, especialmente bajo cuando se modifica la velocidad de agitación. En este contexto, VTO se convierte en un parámetro determinante, ya que influye directamente en la disponibilidad de oxígeno disuelto y, por ende, en la actividad metabólica de la célula. A continuación, en la Figura 7.14 se presenta un análisis de los parámetros respiratorios y su relación con la producción de alginato, con énfasis en cómo las condiciones hidrodinámicas impactan el metabolismo del cultivo.



**Figura 7.14** Relación entre la producción de  $\text{alginato}_{\text{máx}}$  y  $\text{RQ}_{\text{máx}}$  (a),  $\text{PMP}_{\text{máx}}$  de alginato y  $\text{qO}_{2\text{máx}}$  (b) en cultivos por lotes de *A. vinelandii* ATCC 9046 realizados en un biorreactor de 2 L a 100, 300, 500, 700 y 900 rpm.

Al evaluar la influencia de la  $\text{qO}_2$  en la calidad del alginato producido por *A. vinelandii* bajo diferentes velocidades de agitación. En la Figura 7.14 se observó que el RQ no varió significativamente al cambiar la velocidad de agitación, alcanzando valores de aproximadamente 0,94-0,95 entre 500 y 900 rpm, mientras que a 100 y 300 rpm se obtuvieron valores más elevados. En cuanto a la relación entre  $\text{qO}_{2\text{máx}}$  y el PMP del alginato, se evidenció un aumento progresivo de ambos parámetros entre 100 y 500 rpm, alcanzando un  $\text{qO}_{2\text{máx}}$  de 69  $\text{mmol g}^{-1} \text{h}^{-1}$  y un  $\text{PMP}_{\text{máx}}$  de 660 kDa. No obstante, a velocidades superiores, ambos valores disminuyeron, lo que sugiere una relación directa entre la actividad respiratoria y el tamaño del alginato. Este comportamiento podría estar asociado a una respuesta celular frente al estrés hidrodinámico generado por la agitación. Sin embargo, para confirmar esta relación, se requeriría un análisis a nivel genético que permita identificar la posible regulación de genes involucrados en la biosíntesis y exportación del alginato en respuesta a condiciones de cizallamiento.

## 8. RESULTADOS Y DISCUSIONES TERCER OBJETIVO

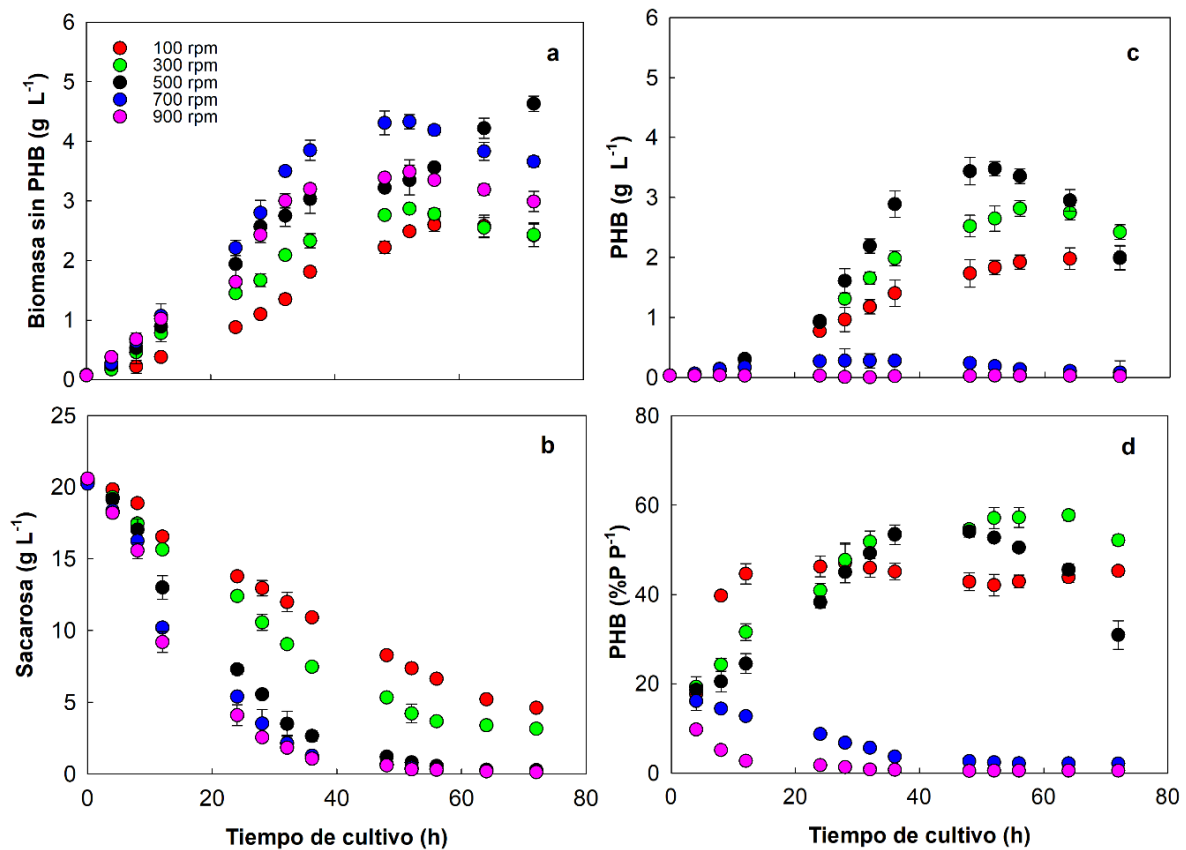
### 8.1. Producción de biomasa, PHB y consumo de sacarosa a diferentes velocidades de agitación.

Se realizaron cultivos por lotes de *A. vinelandii* ATCC 9046 manteniendo las velocidades de agitación seleccionadas en el segundo objetivo. Los cultivos se realizaron nuevamente en la Escuela de Ingeniería Bioquímica, PUCV, Chile, utilizando un biorreactor de 3 L (Applikon, Schiedam, Países Bajos), utilizado para el desarrollo del primer objetivo. Se utilizó un volumen de trabajo de 1,5 L, y el pH se controló a 7,2 mediante un sistema de control usando una solución de NaOH 2 N.

El biorreactor operó a las velocidades de agitación seleccionadas anteriormente, 100, 300, 500, 700 y 900 rpm y a 30 °C. El flujo de aire se mantuvo constante durante el cultivo en 1,5 L min<sup>-1</sup>. La TOD no fue controlada y se midió mediante un sensor de oxígeno polarográfico (Applikon, AppliSens). Los resultados que se presentan a continuación corresponden al valor promedio de tres experimentos independientes y se muestran las desviaciones estándar entre las réplicas.

La Figura 8.1 muestra la evolución del crecimiento celular, de la sacarosa y la producción de PHB obtenida en cultivos por lotes de *A. vinelandii* ATCC 9046 a diferentes velocidades de agitación. En la Figura 8.1a se observa que la máxima producción de biomasa (sin considerar PHB) fue de  $4,6 \pm 0,1$  g L<sup>-1</sup> a las 72 h en cultivos realizados a 500 rpm, mientras que la menor concentración de biomasa ( $2,6 \pm 0,1$  g L<sup>-1</sup>) se obtuvo a 100 rpm.

La evolución de la sacarosa durante los cultivos se vio afectada por la velocidad de agitación, alcanzándose un agotamiento de la sacarosa a las 72 h de cultivo en los cultivos realizados entre 500 y 900 rpm (Figura 8.1b). En los cultivos desarrollados a 900 rpm, la sacarosa al final del cultivo fue de  $0,1 \pm 0,01$  g L<sup>-1</sup> indicando que fue el nutriente limitante. Por otra parte, en cultivos a bajas velocidades de agitación (100 y 300 rpm) la sacarosa remanente en el cultivo fue entre  $4,6 \pm 0,3$  y  $3,2 \pm 0,2$  g L<sup>-1</sup> respectivamente.



**Figura 8.1** Evolución del crecimiento celular (a) sacarosa (b), PHB (c y d) en cultivos por lotes de *A. vinelandii* ATCC 9046 en un biorreactor de 3 L a 100, 300, 500, 700 y 900 rpm.

La Figura 8.1c muestra la producción de PHB bajo las diferentes condiciones estudiadas. Se obtuvo una máxima producción de PHB en los cultivos realizados a 500 rpm, alcanzando  $3,5 \pm 0,1 \text{ g L}^{-1}$  a las 52 h de cultivo. En los cultivos a 300 rpm, la producción máxima de PHB fue de  $2,8 \pm 0,1 \text{ g L}^{-1}$  (56 h de cultivo), lo cual, fue esperado ya que, la acumulación de PHB se ve favorecida por condiciones de crecimiento desequilibradas que se producen por un exceso de fuentes de carbono en un entorno de limitación por oxígeno, donde un aumento del poder reductor (NADH/NADPH) y de las unidades acetil-CoA bloquea el ciclo metabólico central (ciclo del ácido tricarboxílico), desplazándose hacia la ruta de producción de PHB (Castillo et al., 2013).

Díaz-Barrera et al., (2019) demostraron que variando el contenido de oxígeno en el gas de entrada (9% de oxígeno en la entrada), una menor VTO ( $4,6 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) era la más adecuada para mejorar el contenido intracelular de PHB. Se ha reportado que a un porcentaje bajo de TOD (<1%) se promueve la síntesis de PHB, por lo tanto, el oxígeno disuelto juega un papel crítico en el cultivo en la producción de este biopolímero (Peña et al., 2007; Sabra et al., 2000).

La producción de PHB a 700 y 900 disminuyó considerablemente con respecto a las otras condiciones, alcanzando sólo  $0,3 \pm 0,02 \text{ g L}^{-1}$  a las 28 h de cultivo a 700 rpm y de  $0,4 \pm 0,02 \text{ g L}^{-1}$  a las 8 h de cultivo a 900 rpm. Esto es esperado ya que, Díaz-Barrera et al., (2016) utilizando el mismo microorganismo de este estudio *A. vinelandii* ATCC 9046 (bacteria tipo silvestre) demostraron que un aumento en la velocidad de agitación (de 300 a 600 rpm) incrementó la  $VTO_{\text{máx}}$  (de 2,5 a 9,5  $\text{mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ), lo que se relacionó con una disminución en la producción de PHB. García et al., (2018) por otra parte, utilizando *A. vinelandii* ATCC 9046 en cultivo continuo a diferentes velocidades de agitación, observaron que un aumento de la VTO disminuyó la producción de PHB.

Cabe destacar que, a 500 rpm, la concentración de PHB disminuyó después de las 56 h de cultivo, respectivamente. Esto sugiere que el microorganismo podría haber utilizado el PHB como fuente de carbono y energía debido al agotamiento del sustrato hacia las 50 horas de cultivo. Esto concuerda con lo descrito en la literatura, donde se ha señalado que las bacterias tienden a acumular PHB cuando hay una fuente de carbono disponible y una limitación de otro nutriente esencial. Por tanto, se considera que el PHB actúa como un depósito de carbono movilizable, utilizado por la célula en condiciones de limitación de carbono, favoreciendo así su supervivencia (Müller-Santos et al., 2020).

Finalmente, en la Figura 8.1d se observan los perfiles de acumulación de PHB, destacando que en los cultivos a 100 rpm la acumulación fue similar durante todo el cultivo ( $45 \% \text{ p p}^{-1}$ ). En los cultivos a 300 y 500 rpm, la acumulación de PHB fue similar hasta las 48 h de cultivo (aproximadamente entre  $54,1 \pm 1,2$  y  $55 \pm 1,1 \% \text{ p p}^{-1}$ ). Después de ese tiempo, el contenido de PHB en las células crecidas a 500 rpm disminuyó hasta  $31 \pm 3,2 \% \text{ p p}^{-1}$ , lo cual puede ser explicado como se mencionó anteriormente que *A. vinelandii* tiene la capacidad de utilizar el PHB como fuente de carbono y energía en condiciones de limitación de sustrato (Müller-Santos et al., 2020). Por otra parte, se ha estudiado que el PHB y otros polihidroxicanoatos (PHA) se catabolizan a través de despolimerasas intracelulares o extracelulares, dependiendo de su ubicación. Las despolimerasas extracelulares de PHA degradan los gránulos extracelulares liberados de las células que se acumulan después de la muerte, que contienen polímero desnaturalizado y parcialmente cristalino (Adaya et al., 2018; Jendrossek & Handrick, 2002). A 700 y 900 rpm la acumulación durante el cultivo disminuye considerablemente respecto de la máxima obtenida a 300 rpm en un valor cercano al 80%, lo cual se correlaciona con la producción de PHB.

La Tabla 8.1 muestra los parámetros de fermentación tales como, la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), rendimiento de sustrato en biomasa ( $Y_{X/S}$ ) y velocidad específica de consumo de sacarosa ( $q_s$ ) obtenidos a diferentes velocidades de agitación.

**Tabla 8.1** Parámetros de cultivo ( $\mu$ ,  $Y_{X/S}$  y  $q_s$ ) obtenidos en cultivos por lotes de *A. vinelandii* ATCC 9046 a diferentes velocidades de agitación.

Velocidad de agitación (rpm)	$\mu$ ( $h^{-1}$ )	$Y_{X/S}$ ( $g\ g^{-1}$ )	$q_s$ ( $g\ g^{-1}\ h^{-1}$ )	$R^2$
100	$0,09 \pm 0,01^{***}$	$0,17 \pm 0,02^*$	$0,09 \pm 0,01$	0,998
300	$0,13 \pm 0,02$	$0,18 \pm 0,01$	$0,12 \pm 0,02$	0,992
500	$0,16 \pm 0,01$	$0,22 \pm 0,01^{***}$	$0,15 \pm 0,01$	0,987
700	$0,18 \pm 0,01^{**}$	$0,21 \pm 0,01^{**}$	$0,17 \pm 0,01^{**}$	0,995
900	$0,17 \pm 0,02$	$0,17 \pm 0,02^*$	$0,16 \pm 0,02$	0,989

Los valores corresponden a promedios de tres réplicas independientes  $\pm$  desviación estándar. Las diferencias entre condiciones fueron evaluadas mediante análisis de varianza unidireccional (ANOVA). Se consideraron estadísticamente significativas según el siguiente criterio: \*  $P < 0,05$  (significativo), \*\*  $P < 0,01$  (muy significativo), \*\*\*  $P < 0,001$  (altamente significativo).

La  $\mu$  aumentó con la velocidad de agitación desde  $0,09\ h^{-1}$  a  $0,18\ h^{-1}$  entre 100 rpm y 700 rpm (Tabla 8.1), aunque se observa una disminución a 900 rpm, posiblemente por efectos hidrodinámicos (Díaz-Barrera et al., 2021).

El  $Y_{X/S}$  aumentó entre 100 rpm y 500 rpm, pero disminuyó alrededor de un 25% a 700 rpm y 900 rpm. Esto sugiere que, a altas velocidades de agitación, la fuente de carbono se desvía del crecimiento celular hacia el mantenimiento y la síntesis de productos como alginato y PHB, un comportamiento reportado previamente (Ponce et al., 2021; Medina et al., 2023).

Por otra parte, la  $q_s$  aumentó con la velocidad de agitación de  $0,09$  a  $0,17\ g\ g^{-1}\ h^{-1}$  entre 100 rpm y 700 rpm, lo cual se ha asociado a un incremento en la producción de alginato. Sin embargo, a 900 rpm, la  $q_s$  disminuyó a  $0,16\ g\ g^{-1}\ h^{-1}$ , sugiriendo un nuevo cambio metabólico en la velocidad de consumo, lo que podría explicarse con la síntesis de productos (Lozano et al., 2011). Previamente se ha descrito en diferentes condiciones de cultivo que, un aumento en la VTO mejora el  $q_s$  (Peña et al., 2000). El aumento en el  $q_s$  al aumentar el VTO en condiciones de fijación de nitrógeno podría explicarse considerando que, a un valor de VTO alto, la sacarosa se emplea principalmente para la protección respiratoria (Inomura

et al., 2017), en la que las células 'desperdician' oxígeno adaptando su frecuencia respiratoria al nivel de exposición al oxígeno.

La Tabla 8.2 muestra una comparación de los parámetros de fermentación, tales como rendimiento de sustrato en PHB ( $Y_{PHB/S}$ ) y productividad volumétrica de PHB ( $Q_{PHB}$ ) obtenidos a diferentes velocidades de agitación.

**Tabla 8.2** Parámetros de fermentación ( $Y_{PHB/S}$  y  $Q_{PHB}$ ) obtenidos en cultivos por lotes de *A. vinelandii* ATCC 9046 a diferentes velocidades de agitación.

Velocidad de agitación (rpm)	$Y_{PHB/S}$ (g g <sup>-1</sup> )	$Q_{PHB}$ (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
100	0,12 ± 0,01	0,03 ± 0,02
300	0,17 ± 0,02	0,05 ± 0,02
500	0,18 ± 0,01**	0,07 ± 0,01**
700	0,014 ± 0,01***	0,01 ± 0,01***
900	0,002 ± 0,02***	0,001 ± 0,00***

Los valores corresponden a promedios de tres réplicas independientes ± desviación estándar. Las diferencias entre condiciones fueron evaluadas mediante análisis de varianza unidireccional (ANOVA). Se consideraron estadísticamente significativas según el siguiente criterio: \*  $P < 0,05$  (significativo), \*\*  $P < 0,01$  (muy significativo), \*\*\*  $P < 0,001$  (altamente significativo).

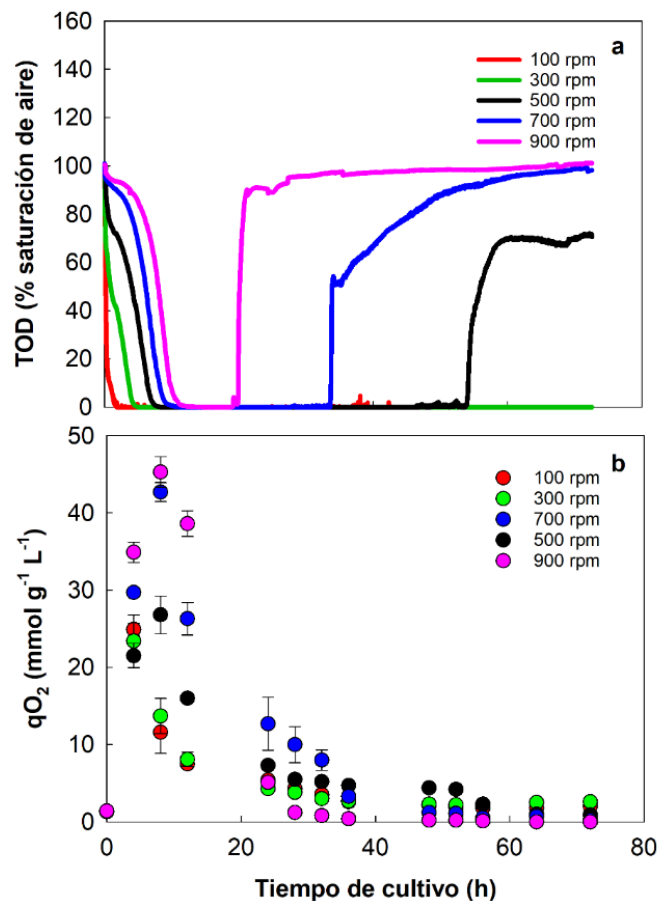
Entre 100 rpm y 500 rpm el  $Y_{PHB/S}$  aumentó de 0,12 a 0,18 g g<sup>-1</sup>, mientras que la  $Q_{PHB}$  de 0,03 a 0,07 g g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Sin embargo, a velocidades de agitación superiores (700 y 900 rpm), ambos parámetros disminuyen ya que casi no se sintetizó PHB en esas condiciones de cultivo (Fig. 8.1).

Estos hallazgos se comparan con reportes previos, donde Díaz-Barrera et al., (2016), quienes evaluaron la producción de PHB en *A. vinelandii* (silvestre y mutante OP) a diferentes agitaciones (300-600 rpm). Si bien obtuvieron rendimientos de  $Y_{PHB/S}$  superiores (0,20 - 0,35 g g<sup>-1</sup>) a los de esta investigación, cabe destacar que sus cultivos se realizaron con una fuente de nitrógeno (extracto de levadura), lo que probablemente favoreció una mayor acumulación de PHB al no existir limitación de nitrógeno, un factor conocido por inducir la síntesis de este polímero de reserva. Por otra parte, Padilla-Córdova et al., (2020) investigaron la producción de PHB por *A. vinelandii* bajo fijación de nitrógeno se evaluó utilizando una modalidad de lote extendido bajo diferentes VTO en el biorreactor. Los cultivos por lote extendido se realizaron utilizando diferentes velocidades de agitación de agitación (400, 600, 800 y 1000 rpm). Ellos

determinaron que, un aumento de la VTO por sobre 800 rpm disminuyó la acumulación del PHB, afectando la  $Q_{\text{PHB}}$ .

Se determinó la evolución de la TOD y de la  $q_{\text{O}_2}$  en cultivos de *A. vinelandii* en un biorreactor de 3 L a diferentes velocidades de agitación (Fig. 8.2). La Figura 8.2a muestra los perfiles típicos de TOD, evidenciando que los cultivos se encuentran limitados por oxígeno ya que, alcanzó valores cercanos a cero durante la etapa de crecimiento. Este nivel de TOD (cercano a cero) se mantuvo durante al menos entre 22 - 68 h, dependiendo de la velocidad de agitación del cultivo. Luego la TOD aumentó debido al final del crecimiento celular a 500, 700 y 900 rpm.

La figura 8.2b muestra la evolución de la  $q_{\text{O}_2}$  a lo largo del tiempo y se puede observar que, durante las primeras horas de cultivo (0 - 16 h de cultivo), a altas velocidades de agitación (900 rpm) la  $q_{\text{O}_{2\text{máx}}}$  alcanzó  $45,3 \pm 2,0 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , mientras que a bajas velocidades de agitación (100 rpm) el valor de la  $q_{\text{O}_{2\text{máx}}}$  fue de  $14,9 \pm 0,8 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . El valor más alto obtenido a altas velocidades de agitación podría indicar que el flujo de carbono a través del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) se incrementa, como se ha informado previamente (Castillo et al., 2013). Un ciclo de TCA más activo podría favorecer la generación de energía, fundamental para la síntesis de precursores de alginato (Mærk et al., 2020). Una menor concentración de acetil-CoA disponible para la biosíntesis de PHB podría explicar la menor acumulación de PHB a altas velocidades de agitación. Con base en estas observaciones, en condiciones de alta velocidad de agitación un cambio metabólico determinado por el carbono que entra en el ciclo de TCA podría explicar la producción de PHB y alginato que se muestra más adelante.



**Figura 8.2** Evolución de los perfiles de la TOD (a) y  $qO_2$  (b) en cultivo por lotes de *A. vinelandii* ATCC 9046 en un biorreactor de 3 L a 100, 300, 500, 700 y 900 rpm.

Se compararon los valores de  $qO_{2m\acute{a}x}$  obtenidos en ambos biorreactores (Sartorius de 2 L y Applikon de 3 L), presentados en la Tabla 8.3, donde se evidenció que existe un aumento progresivo de la  $qO_{2m\acute{a}x}$  con el incremento de la velocidad de agitación en ambos sistemas, lo que sugiere una mayor disponibilidad de oxígeno disuelto y, por tanto, una mayor actividad metabólica celular.

A bajas velocidades de agitación (100 - 300 rpm), los valores de  $qO_{2m\acute{a}x}$  fueron similares entre ambos biorreactores. Sin embargo, a velocidades más altas (500 - 900 rpm), hay una diferencia observándose un aumento en la  $qO_{2m\acute{a}x}$  obtenida en el biorreactor Applikon. Por ejemplo, a 900 rpm, la  $qO_{2m\acute{a}x}$  alcanzó  $45,3 \pm 2,0$  mmol g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> en el biorreactor Applikon, en comparación con  $34,7 \pm 2,6$  mmol g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> en el biorreactor Sartorius.

**Tabla 8.3** Comparación de los valores de  $qO_{2m\acute{a}x}$  en ambos reactores utilizados mediante dos métodos de determinación diferentes

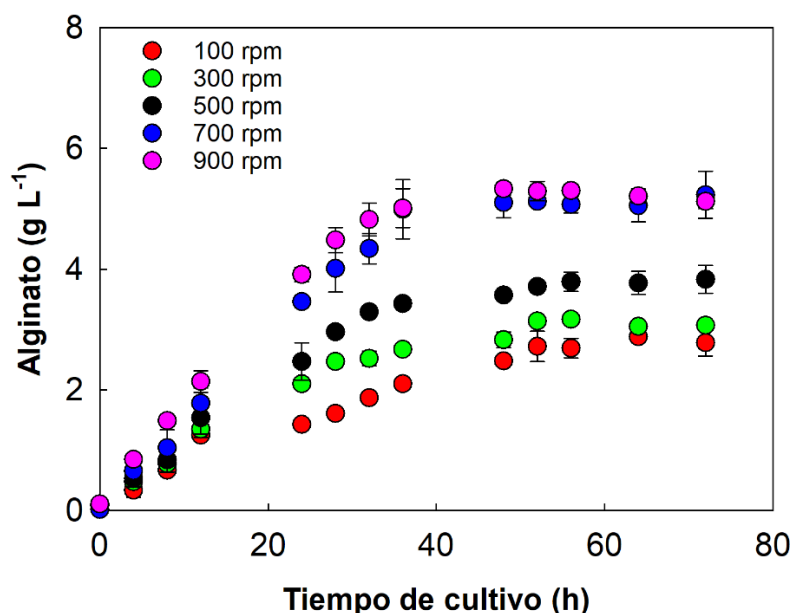
Velocidad de agitación (rpm)	$qO_{2m\acute{a}x}$ (mmol g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	$qO_{2m\acute{a}x}$ (mmol g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
	B. Sartorius (2 L)	B. Applikon (3 L)
100	20,1 ± 2,2*	21,9 ± 0,8
300	19,8 ± 1,4*	23,4 ± 0,9
500	29,1 ± 1,3	26,8 ± 2,4
700	32,7 ± 2,4	42,7 ± 1,2**
900	34,7 ± 2,6	45,3 ± 2,0**

Los valores corresponden a promedios de tres réplicas independientes ± desviación estándar. Las diferencias entre condiciones fueron evaluadas mediante análisis de varianza unidireccional (ANOVA). Se consideraron estadísticamente significativas según el siguiente criterio: \* P < 0,05 (significativo), \*\* P < 0,01 (muy significativo), \*\*\* P < 0,001 (altamente significativo).

Estas diferencias pueden atribuirse, en parte, a la metodología empleada para el cálculo de la  $qO_2$ . En el biorreactor Sartorius, se aplicó una correlación empírica para estimar el  $k_L a$  considerando la viscosidad del medio, lo cual permitió calcular VTO y, posteriormente,  $qO_2$ . Esta metodología incorpora el efecto del aumento de viscosidad asociado a la producción de alginato, lo que probablemente afecta la eficiencia de transferencia de oxígeno y, por ende, el valor de  $qO_2$ . En contraste, en el biorreactor Applikon la Ecuación 5.13, que no considera los factores anteriormente mencionado. Esto podría haber sobreestimado los valores de  $qO_2$  especialmente en condiciones donde se acumulan biopolímeros que afectan tanto la reología del medio.

## 8.2. Efecto de la velocidad de agitación sobre la producción de alginato en cultivos por lotes de *A. vinelandii* ATCC 9046

En la Figura 8.3 se muestra el perfil de producción de alginato en cultivos por lotes de *A. vinelandii* ATCC 9046 a diferentes velocidades de agitación. Se muestra que a altas velocidades de agitación (entre 700 y 900 rpm) la concentración de alginato fue similar y cercana a  $5,3 \pm 0,1$  g L<sup>-1</sup> a las 48 h de cultivo. En cambio, a una baja velocidad de agitación (100 rpm) la producción de alginato fue  $2,9 \pm 0,1$  g L<sup>-1</sup> a las 64 h de cultivo.



**Figura 8.3** Perfil de la producción de alginato en cultivos por lotes de *A. vinelandii* ATCC 9046 realizados a diferentes velocidades de agitación.

Estudios previos han reportado que la producción de alginato se ve afectada por cambios de la velocidad de agitación. Díaz-Barrera et al., (2007) demostró que un cambio en la velocidad de agitación de 260 a 560 rpm la concentración de alginato aumentó tres veces. Díaz-Barrera et al., (2021) demostró que un aumento en la velocidad de agitación entre 300 y 700 rpm generó un aumento en la producción de alginato cercana a un 40 %. A modo de complementar estos resultados, la concentración de alginato más alta reportada ha sido por Ponce et al., (2021) donde ellos obtuvieron una concentración cercana a  $5,5 \text{ g L}^{-1}$  de alginato bajo una VTO controlada en cultivos por lotes de *A. vinelandii*.

Estudios previos han reportado que la producción de alginato se ve afectada por VTO del cultivo (Peña et al., 2011; Díaz-Barrera et al., 2007). Díaz-Barrera et al., (2014) demostró que un cambio en la VTO (aproximadamente 25%) aumentó la producción de alginato en solo  $0,2 \text{ g L}^{-1}$ . En cambio, una variación del 67% en la VTO aumentó la concentración de alginato aproximadamente tres veces. De manera similar, Peña et al., (2011) demostraron que un aumento de la VTO de  $2,6$  a  $6,0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (aumento del 57%) mejoró la concentración de alginato en  $1,0 \text{ g L}^{-1}$ . Dada esta evidencia y considerando que, en las condiciones evaluadas (si se observó una diferencia en la VTO, es posible que una de las razón de la mayor producción de alginato se deba al efecto de la VTO a través del cambio de agitación.

En la Tabla 8.4 se muestran los parámetros de fermentación, tales como concentración de alginato máxima ( $C_{\text{Alg}m\acute{x}}$ ), rendimiento de biomasa en alginato ( $Y_{\text{Alg}/x}$ ),

rendimiento de sustrato en alginato ( $Y_{Alg/S}$ ), productividad volumétrica ( $Q_{Alg}$ ) y específica de alginato ( $q_{Alg}$ ) obtenidos bajo las condiciones evaluadas.

**Tabla 8.4** Parámetros de fermentación ( $Y_{Alg/X}$ ,  $Y_{Alg/S}$ ,  $Q_{Alg}$  y  $q_{Alg}$ ) obtenidos mediante cultivos por lotes de *A. vinelandii* ATCC 9046

Velocidades de agitación (rpm)	$C_{Algmáx}$ (g L <sup>-1</sup> )	$Y_{Alg/X}$ (g g <sup>-1</sup> )	$Y_{Alg/S}$ (g g <sup>-1</sup> )	$Q_{Alg}$ (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	$q_{Alg}$ (g g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
100	2,9 ± 0,04	1,1 ± 0,02	0,2 ± 0,02	0,04 ± 0,02	0,02 ± 0,003
300	3,2 ± 0,03	1,1 ± 0,02	0,2 ± 0,01	0,06 ± 0,02	0,02 ± 0,03
500	3,8 ± 0,2	0,9 ± 0,01	0,2 ± 0,03	0,07 ± 0,01	0,02 ± 0,001
700	5,2 ± 0,4***	1,4 ± 0,01**	0,3 ± 0,01**	0,07 ± 0,02	0,03 ± 0,002
900	5,3 ± 0,1***	1,6 ± 0,01**	0,3 ± 0,02**	0,11 ± 0,01**	0,03 ± 0,002**

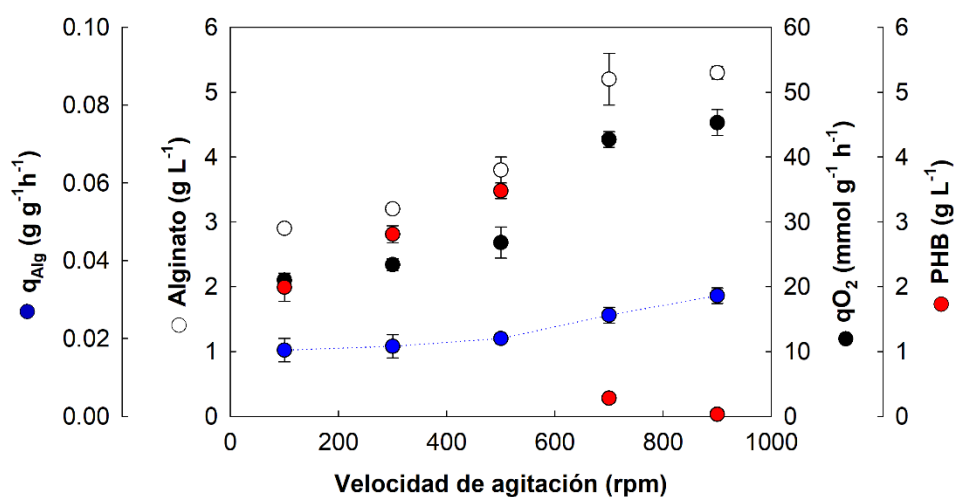
Los valores corresponden a promedios de tres réplicas independientes ± desviación estándar. Las diferencias entre condiciones fueron evaluadas mediante análisis de varianza unidireccional (ANOVA). Se consideraron estadísticamente significativas según el siguiente criterio: \*  $P < 0,05$  (significativo), \*\*  $P < 0,01$  (muy significativo), \*\*\*  $P < 0,001$  (altamente significativo).

Entre 100 y 500 rpm el  $Y_{Alg/X}$  es estadísticamente similar. A 700 y 900 rpm el valor de  $Y_{Alg/X}$  aumenta desde  $1,4 \pm 0,01$  a  $1,6 \pm 0,02$  g g<sup>-1</sup>, esto se debe al incremento de la producción de alginato (Figura 8.3). De acuerdo con los valores obtenidos a 600 rpm, se ha descrito previamente en *P. areuginosa* que un incremento en los valores de  $Y_{Alg/X}$  podría atribuirse a una copia extra del gen *alg8* que codifica para la polimerización del alginato (cataliza la transferencia de una molécula de azúcar de un donador activado a una molécula aceptora) (Remminghorst & Rehm, 2006), esto nos indica que el incremento en  $Y_{Alg/X}$ , podrían ser cambios en la expresión del gen *alg8* lo cual se revisará más adelante.

Se puede observar que  $Y_{Alg/S}$  es similar a velocidad de agitación entre 100 y 500 rpm. De acuerdo con lo publicado por otros autores, se han observado valores de  $Y_{Alg/S}$  muy similares para las condiciones de estudio (Día-Barrera et al., 2021; Ponce et al., 2021, Díaz-Barrera et al., 2014).

La  $Q_{Alg}$  obtenida en cultivos a 900 rpm fue el valor más alto ( $0,11$  g g<sup>-1</sup>) con respecto a las otras condiciones. Se sabe que la producción de alginato depende del consumo de sacarosa y, generando el ácido polimanurónico el precursor de la biosíntesis.

Se determinó la  $q_{Alg}$  a las diferentes condiciones de cultivo, obteniéndose una productividad específica entre 100 y 500 rpm de  $0,02 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , sin embargo, a aumentar entre 700 y 900 rpm se observa un valor de  $0,03 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Valores similares fueron reportados por Díaz-Barrera et al., (2021) entre 300 y 700 rpm entre  $0,014$  y  $0,017 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .



**Figura 8.4** Relación entre la producción de alginato<sub>máx</sub>,  $q_{Alg}$ , producción de PHB<sub>máx</sub> y  $qO_{2máx}$  a diferentes velocidades de agitación en cultivos por lotes de *A. vinelandii* ATCC 9046 en biorreactor de 3 L.

En la Figura 8.4 se observa un análisis entre la producción de alginato, la  $q_{Alg}$  y la  $qO_2$ , se observa una correlación positiva con el incremento de la velocidad de agitación. A medida que aumenta la agitación, tanto  $qO_2$  como la concentración de alginato aumentan, alcanzando valores máximos a 900 rpm. De igual forma,  $q_{Alg}$  también muestra un incremento, lo que sugiere que una mayor disponibilidad de oxígeno no solo favorece la producción total de alginato, sino que también mejora su síntesis a nivel celular. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Díaz-Barrera et al., (2016), quienes compararon la actividad respiratoria de *A. vinelandii* ATCC 9046 y OP, (un microorganismo incapaz de sintetizar alginato). Ellos demostraron que al utilizar *A. vinelandii* OP incapaz de producir alginato se observó una VTO y  $qO_2$  menor en comparación a *A. vinelandii* ATCC 9046, indicando que la síntesis de alginato está asociada a una mayor demanda de oxígeno. Esto sugiere que la producción de alginato es un proceso energéticamente costoso, reflejado en una mayor velocidad de respiración.

Adicionalmente, Jiménez et al., (2016) estudiaron un microorganismo con deficiencia en la producción de PHB, *A. vinelandii* AT6 (phbB::mini-Tn5-lacZ), observando un aumento significativo en la producción de alginato y  $qO_2$  en comparación con *A. vinelandii* ATCC 9046.

Específicamente, *A. vinelandii* AT6 mostró un incremento de 2,5 veces en el rendimiento de alginato y un 62 % en  $qO_2$  lo que respalda la hipótesis de que, al redirigir el carbono desde PHB hacia alginato, se estimula tanto la actividad respiratoria como la producción de este exopolisacárido.

Con base en la evidencia presentada, se establece una relación directa entre el incremento de la velocidad de agitación y la producción de alginato en cultivos por lotes de *A. vinelandii* ATCC 9046, mediada por la  $qO_2$ . A velocidades de agitación elevadas (700 y 900 rpm), se observa un aumento significativo en la VTO, lo que se traduce en valores más altos de  $qO_2$ , indicando un mayor consumo de oxígeno. Este incremento desencadena una respuesta metabólica en *A. vinelandii*, caracterizada por un aumento de la actividad respiratoria y una mayor síntesis de alginato.

Por otra parte, la Figura 8.4 muestra la relación inversa entre la producción de PHB y la de alginato a diferentes velocidades de agitación, y su relación con la  $qO_2$ . A bajas velocidades (100 - 500 rpm), se observa un aumento de ambos productos, mientras que, a partir de 500 rpm, la producción de alginato se incrementa progresivamente, alcanzando su valor máximo a 900 rpm ( $5,2 \text{ g L}^{-1}$ ). En contraste, la producción de PHB disminuye de forma hasta valores cercanos a  $0,03 \text{ g L}^{-1}$ . Este comportamiento sugiere un cambio metabólico inducido por el aumento en la disponibilidad de oxígeno, en el cual el carbono es preferentemente dirigido hacia la síntesis de alginato en lugar de PHB. La síntesis de PHB parece ser favorecida en condiciones de velocidades de agitación bajas, actuando como un mecanismo de almacenamiento de carbono.

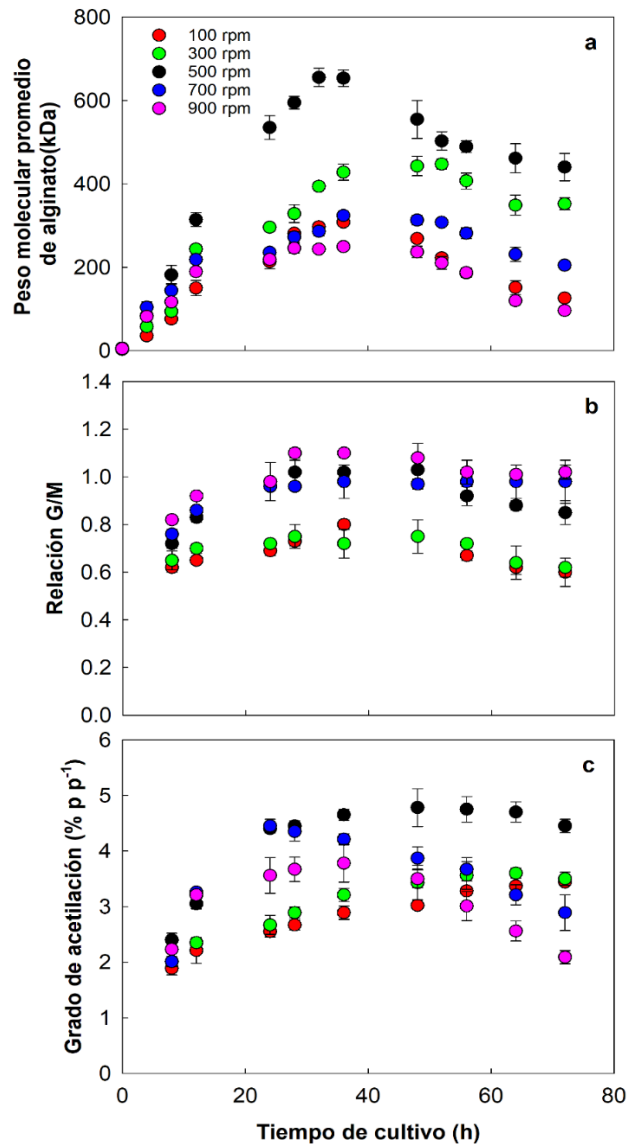
Esta relación inversa observada entre la producción de alginato y la de PHB sugiere una redistribución del flujo de carbono hacia la ruta de alginato en vez de la producción de PHB a altas velocidades de agitación. Esta dinámica refleja la capacidad de *A. vinelandii* para modular su metabolismo secundario en respuesta a las condiciones hidrodinámicas del cultivo, y que la modulación de la velocidad de agitación puede ser una estrategia eficaz para dirigir la biosíntesis hacia productos de interés industrial como el alginato.

### 8.2.1. Evolución del peso molecular promedio, relación G/M y grado de acetilación del alginato producido a diferentes velocidades de agitación

Como se ha mencionado, la composición del alginato producido depende del peso molecular, la relación gulurónico/manurónico (G/M) y el grado de acetilación. Estos parámetros permiten caracterizar y conocer la calidad del alginato, ya que varían según el tipo de microorganismo y las condiciones de cultivo. Estos factores determinan las propiedades reológicas de los alginatos (Urtuvia et al., 2017; Hecht & Srebnik, 2016; Pawar & Edgar, 2012). En la figura 8.5 se observa los perfiles de caracterización del alginato: peso molecular promedio, relación G/M y el grado de acetilación en cultivos por lotes de *A. vinelandii* a diferentes velocidades de agitación.

En la Figura 8.5a se muestra el perfil del PMP a las diferentes condiciones de agitación. A 100 rpm el  $PMP_{m\acute{a}x}$  fue de  $308 \pm 12$  kDa a las 36 h de cultivo y luego disminuyó hasta  $126,1 \pm 8,2$  kDa a las 72 h de cultivo. Al aumentar la velocidad de agitación a 300 rpm el  $PMP_{m\acute{a}x}$  fue de  $442 \pm 23$  kDa a las 48 h de cultivo y luego disminuyó hasta  $352 \pm 14$  kDa al finalizar el cultivo. En cultivos desarrollados a 500 rpm el  $PMP_{m\acute{a}x}$  del alginato fue de  $655 \pm 22$  kDa durante la fase de crecimiento (8 - 32 h de cultivo) y el valor más alto con respecto a las otras velocidades de agitación. Posteriormente disminuyó a  $440 \pm 33$  kDa a las 72 h de cultivo. Por otro lado, entre 700 y 900 rpm el  $PMP_{m\acute{a}x}$  alcanzado es de  $324 \pm 6$  y  $250 \pm 7$  kDa respectivamente. Sin embargo, el PMP del alginato disminuyó un 40% a las 72 h de cultivo.

Lozano et al., (2011) demostró que en cultivos a una TOD controlada (0,5 y 5 %) con un aumento en la velocidad de agitación de 300 a 700 rpm, provocó un aumento significativo en la  $VTO_{m\acute{a}x}$ , mejorando la producción de alginato. Por el contrario, el PMP del alginato disminuyó al aumentar la VTO. Al establecer una relación con la biosíntesis de alginato, Ponce et al., (2021) que la actividad de las alginato liasas tales como *alyA1* y *algL* podrían ser las responsables de la degradación del PMP del alginato debido a su alta actividad durante la fase pre estacionaria de un cultivo por lotes.



**Figura 8.5** Perfil de caracterización de alginato: PMP (a) relación G/M (b) y grado de acetilación (c) en cultivos por lotes de *A. vinelandii* realizados a diferentes velocidades de agitación (100, 300, 500, 700 y 900 rpm).

Respecto de la relación G/M e la Figura 8.5b se puede observar que la relación G/M depende de la velocidad de agitación. En los cultivos desarrollados a 100 y 300 rpm la relación G/M varió de  $0,70 \pm 0,02$  (24 h) a  $0,72 \pm 0,1$  (56 h), y disminuyó hasta  $0,60 \pm 0,1$  hasta el final del cultivo. En cultivos desarrollados a 500 rpm la relación G/M mostró una mayor variación durante el cultivo, aumentando de  $0,72 \pm 0,02$  a  $1,03 \pm 0,1$  durante la fase de crecimiento celular (8 a 48 h) y luego disminuyó a  $0,85 \pm 0,1$  luego de las 48 h de cultivo. A 700 y 900 rpm se puede observar que la relación G/M se mantiene más constante lo largo del cultivo con un valor cercano  $1,02 \pm 0,02$  durante la fase de crecimiento y estacionaria.

La disminución en la relación G/M se puede atribuir a la expresión de las epimerasas, se sabe que AlgE7 es una enzima bifuncional con actividades de alginasa y C-5 epimerasa. Gaardløs et al., (2022) determinaron que, la estructura y las propiedades funcionales de los alginatos están dictadas por la composición monomérica y la distribución del peso molecular. Las C-5-epimerasas de manuronato determinan la composición monomérica al catalizar la epimerización de los residuos de ácido  $\beta$ -D-manurónico (M) en residuos de ácido  $\alpha$ -L-gulurónico (G). El peso molecular es afectado por las liasas de alginato, que catalizan un mecanismo de  $\beta$ -eliminación que escinde las cadenas de alginato. Los mecanismos de reacción para las reacciones de epimerización y liasa son similares. Estas enzimas dualistas comparten una alta identidad de secuencia con las C-5-epimerasas de manuronato sin actividad liasa. El mecanismo detrás de su actividad y los residuos de aminoácidos responsables de ella aún no se conocen completamente, pero se ha llegado a descubrir que, el mecanismo de esta reacción es dual para la actividad epimerasa y liasa, por ende, a disminuir el peso molecular por acción de las liasas, la epimerización del alginato también disminuye.

Existen algunos reportes sobre la relación G/M, realizados tanto en matraces como en biorreactores utilizando diferentes tipos de bacterias de *A. vinelandii*, con diferentes tipos de fuentes de nitrógeno. Díaz-Barrera et al. (2021) evaluó el peso molecular y la relación G/M en cultivos por lotes realizados bajo condiciones diazotróficas a diferentes velocidades de agitación. En este estudio, se reportó que un cambio en la VTO tiene un efecto sobre la relación G/M, observando que esta relación puede incrementarse de 0,7 a 0,86 al incrementar el  $VTO_{m\acute{a}x}$  de 5 a 10,4  $mmol L^{-1} h^{-1}$  a través de cambios en la velocidad de agitación.

Por otra parte, Gaytán et al., (2012) estudió el microorganismo *A. vinelandii* ATCN4, la cual contiene una inserción del gen *nqrE* que codifica una subunidad del complejo translocador de sodio dependiente de NADH: ubiquinona oxidoreductasa ( $Na^+$ -NQR). En este estudio, se informó que, en condiciones de fijación de nitrógeno, este microorganismo es capaz de producir alginatos con una alta relación G/M (cercana a 2); curiosamente, cuando se complementó el extracto de levadura en el medio de cultivo, esta relación aumentó a la relación G/M más alta (4,5) reportada actualmente para los alginatos producidos en cultivos de *A. vinelandii*.

La Figura 8.5c muestra el perfil del grado de acetilación a diferentes velocidades de agitación. A 100 rpm se obtuvo un valor de grado de acetilación máximo de  $3,44 \pm 0,10$  %  $p^{-1}$  a las 72 h de cultivo. A medida que aumenta la velocidad de agitación a 300 rpm a las 56 h de cultivo se alcanzó un valor máximo de  $3,60 \pm 0,30$  %  $p^{-1}$ . A 500 rpm se obtuvo el mayor

valor respecto de todas las condiciones de cultivo de  $4,80 \pm 0,34 \text{ \% p p}^{-1}$  a las 48 h de cultivo y se mantuvo constante hasta el final del cultivo. Finalmente, a 700 a 900 rpm se observa que el grado de acetilación máximo fue de  $3,22 \pm 0,10$  y  $3,25 \pm 0,22 \text{ \% (p p}^{-1})$  a las 28 y 36 h de cultivo respectivamente, sin embargo, luego este valor disminuye hasta valores cercano entre  $2,90 \pm 0,32$  y  $2,10 \pm 0,12 \text{ \% p p}^{-1}$ .

Castillo et al. (2013) evaluaron los efectos de la TOD y  $\mu$  sobre el grado de acetilación del alginato en cultivos por lotes y continuos de *A. vinelandii* ATCC 9046 limitados por glucosa. Los autores señalaron que la acetil-CoA no se utiliza exclusivamente para la producción de PHB, sino que también actúa como donador de grupos acetilo en la acetilación del alginato (Franklin et al., 2004). En matraces, demostró que el grado de acetilación del alginato fue 2,6 veces mayor en los cultivos cultivados en condiciones de baja aireación (matraces convencionales), donde se observó un grado de acetilación del  $4,7 \pm 0,5 \text{ \% p p}^{-1}$  en comparación con un grado de acetilación de  $1,8 \pm 0,6 \text{ \% p p}^{-1}$  para los cultivos cultivados en matraces con deflectores. Además, Castillo et al., (2013) demostró en biorreactor, que, a una TOD a de 9% resultó en un alto grado de acetilación del alginato (6,88%). Por el contrario, un aumento de  $\mu$  tuvo efectos negativos en la producción y acetilación del polímero. Con un contenido alto de TOD (9%) y un  $\mu$  bajo, se observó una disminución en la velocidad de respiración, lo que sugiere que el flujo de acetil-CoA (el donador de acetilo) se desvió hacia la acetilación del alginato. Estos cambios respaldan la hipótesis de que la disponibilidad de acetil-CoA para la acetilación del alginato aumenta en condiciones de baja aireación de la misma manera que se ha descrito para la producción de PHB.

### **8.2.2. Producción y caracterización de hidrogeles de alginato bacteriano con potencial en biomedicina**

Luego de estudiar y caracterizar el alginato a las diferentes velocidades de agitación, se realizaron hidrogeles de alginato bacteriano evaluando sus propiedades de peso molecular, razón G/M y grado de acetilación y propiedades hidráulicas con potencial en biomedicina. En primer lugar, se utilizaron los alginatos producidos en los objetivos anteriores a diferentes velocidades de agitación (100, 300, 500, 700, 900 rpm) y fueron a tiempos de cultivo específicos (48 y 72 horas). A cada tipo de alginato se le determinó el PMP, el índice de polidispersión, la razón G/M y el grado de acetilación.

El alginato producido y recuperado a diferentes velocidades de agitación se utilizó para elaborar diversos hidrogeles mediante reticulación iónica. La Tabla 8.5 muestra los valores de PMP, índice de polidispersión, grado de acetilación y la razón G/M. Es importante mencionar inicialmente que estos alginatos producidos se recuperaron en diferentes tiempos de cultivo según para ser probados en el área de biomedicina donde se necesitan PMP de alginato elevados (Hoefer et al., 2015; Schmid and Picker-Freyer, 2009). A 100 rpm y 500 rpm, la recuperación se realizó a las 48 h de cultivo, obteniendo PMP de alginato de  $300 \pm 32$  kDa y  $654 \pm 45$  kDa, respectivamente, siendo este último el más alto en comparación con las otras condiciones de cultivo. A 300, 700 y 900 rpm, el alginato se recuperó a las 72 h de cultivo, obteniéndose PMP de  $352 \pm 44$  kDa (300 rpm),  $205 \pm 29$  kDa (700 rpm) y el PMP más bajo de  $97 \pm 4$  kDa (900 rpm).

**Tabla 8.5** Caracterización de alginatos bacterianos extraídos a diferentes velocidades de agitación en cultivo por lotes de *A. vinelandii*

<b>Parámetro</b>	<b>100 rpm</b>	<b>300 rpm</b>	<b>500 rpm</b>	<b>700 rpm</b>	<b>900 rpm</b>
<b>Tiempo de recuperación del cultivo (h)</b>	48	72	48	72	72
<b>Peso Molecular Promedio (kDa)</b>	$300 \pm 32$	$352 \pm 44$	$654 \pm 45$	$205 \pm 29$	$97 \pm 4$
<b>Índice de polidispersión</b>	$1,9 \pm 0,1$	$1,5 \pm 0,3$	$1,3 \pm 0,1$	$1,6 \pm 0,2$	$2,0 \pm 0,2$
<b>Razón G/M</b>	$0,7 \pm 0,02$	$0,8 \pm 0,04$	$1,0 \pm 0,05$	$1,0 \pm 0,09$	$1,0 \pm 0,03$
<b>Grado de acetilación (%)</b>	$2,9 \pm 0,1$	$3,5 \pm 0,1$	$4,7 \pm 0,1$	$2,9 \pm 0,3$	$2,1 \pm 0,1$

Se han reportado que en condiciones de diazotrofia en cultivos por lotes se han obtenido valores alrededor entre los 400 y 500 kDa trabajando en un rango de velocidades de agitación de 500 a 700 rpm (Díaz-Barrera et al., 2021; Ponce et al., 2021; Díaz-Barrera et al., 2014). Si bien, a 100 y 900 rpm es primera vez que se han reportado valores de PMP de alginato, se puede observar que el valor PMP de alginato a 100 rpm recuperado a las 48 h de cultivo es muy similar a 300 rpm. A 900 rpm no existen datos referentes al PMP del alginato, sin embargo, existen algunos estudios que reportan PMP de alginato más bajos que el de este estudio. Utilizando extracto de levadura en el medio de cultivo y a 700 rpm se han informado PMP de 38 y 60 kDa controlando el valor de la TOD entre 1 y 3% respectivamente (Seáñez et al., 2001; Peña et al., 2000). Parente et al., (2000) estudiaron el crecimiento y la

producción de alginato por *A. vinelandii* DSM576 en función de la concentración inicial de sulfato de amonio ( $0,45 - 1,05 \text{ g L}^{-1}$ ) y velocidad de agitación (300–700 rpm) en cultivos por lotes. Estos autores reportaron un PMP de alginato entre 20 y 350 kDa, destacando que a 600 rpm el PMP<sub>máx</sub> del alginato que se obtuvo fue de 180 kDa.

Se analizó el índice de polidispersión (PI), el cual es una medida de la distribución de los tamaños de las moléculas de polímero en una muestra dada. En el contexto de los polisacáridos, indica qué tan variados son los tamaños de las cadenas de polisacáridos. Se sabe que PI cercano a un valor de 1 indica que todas las cadenas de polímero tienen el mismo tamaño (muestra monodispersa). Un PI mayor que 1 indica que hay una distribución de tamaños de cadena (muestra polidispersa) (Porta et al., 2013; Rogošić et al., 1996; Schurtenberger & Augusteyn, 1991).

De la Tabla 8.5 se observa que el PI del alginato disminuyó entre 100 y 500 rpm, pasando de  $1,9 \pm 0,1$  a  $1,3 \pm 0,1$ . Posteriormente, el PI aumentó nuevamente, alcanzando valores de  $1,6 \pm 0,2$  a 700 rpm y de  $2,4 \pm 0,2$  a 900 rpm. Estos resultados indican que a 500 rpm se obtiene una distribución de tamaños más homogénea (monodispersa), mientras que a bajas y altas velocidades de agitación el sistema tiende a ser más heterogéneo en cuanto al tamaño de las cadenas de alginato.

Peña et al. (2002) estudiaron la producción de alginato en mutantes de *A. vinelandii* con alteraciones en las rutas de biosíntesis de PHB y alginato. Una de las bacterias analizadas, *A. vinelandii* DS268, que es una bacteria derivada de ATCC 9046 que lleva una inserción mini-Tn5 en el gen *phbR*, el cual codifica un regulador transcripcional del operón *phbBAC* (Peralta-Gil et al., 2002). Esta modificación afecta la síntesis de PHB y, en consecuencia, puede influir en la ruta del alginato. También se estudió *A. vinelandii* WI12, otro microorganismo derivado de ATCC 9046, que contiene una fusión transcripcional del gen *algD* (GDP-manosa deshidrogenasa) con el gen reportero *lacZ* (Campos et al., 1996).

En estos estudios, los valores de PI obtenidos para los alginatos sintetizados por estas bacterias mutantes variaron entre 1,3 y 3,1, lo que concuerda con el rango observado en los cultivos actuales. Esto sugiere que tanto las condiciones hidrodinámicas como la regulación genética de las rutas de biosíntesis pueden influir significativamente en la distribución de pesos moleculares del alginato, lo cual impacta directamente en sus propiedades funcionales.

Por otra parte, Díaz-Barrera et al., (2010) estudiaron la producción de alginato por *A. vinelandii* en cultivos continuos a diferentes tasas de dilución (D) y concentraciones de

sacarosa de entrada de 5 y 20 g L<sup>-1</sup>. Ellos determinaron que a ambas concentraciones de sacarosa de entrada obtuvieron valores de PI similares de los alginatos en estado estacionario (entre 4 y 6) y estos valores no se vieron afectados por los cambios en *D*.

Trujillo-Roldán et al., (2015), estudiaron la producción, el peso molecular y el poder viscosificante del alginato producido por *A. vinelandii* en cultivos sumergidos utilizando diferentes fuentes de carbono. El índice de polidispersidad de los alginatos obtenidos de todas las fuentes de C fue inferior a 1,3. Estos valores demostraron que los alginatos son monodispersos, sin diferencias significativas, utilizando matraces con agitación.

La relación G/M también se analizó en función de las distintas velocidades de agitación, y se observó un aumento en los valores desde  $0,7 \pm 0,02$  hasta  $1,0 \pm 0,03$  entre 100 y 900 rpm. Estos valores concuerdan con las condiciones de cultivo empleadas, lo que se ve respaldado por estudios previos. Dichos estudios han demostrado una relación directa entre la VTO<sub>máx</sub> (debido al cambio en la velocidad de agitación) y la proporción G/M (Díaz-Barrera et al, 2021), así como entre la velocidad de agitación y el incremento en el porcentaje de ácido gulurónico (Sabra et al., 2000). Si bien los valores de G/M reportados anteriormente para esta bacteria eran ligeramente inferiores cercano a 0,8 (Díaz-Barrera et al., 2021; Peña et al., 2006), los resultados actuales sugieren que las condiciones de cultivo tienen una influencia significativa en la composición del alginato.

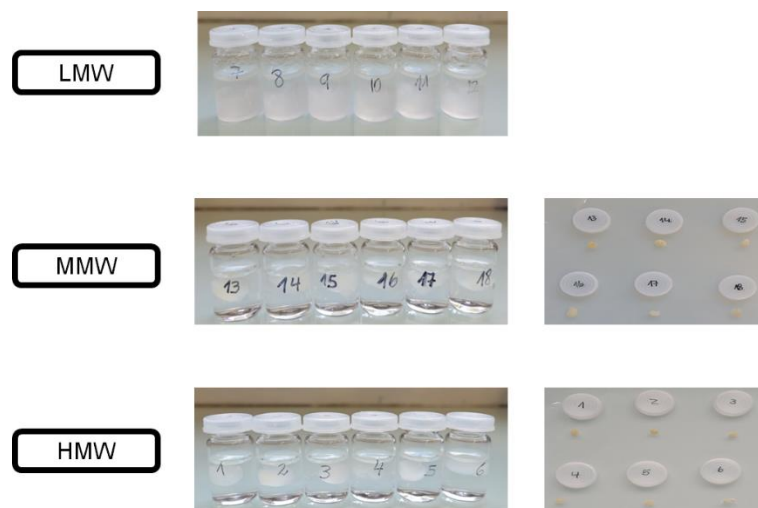
Debido a la posterior aplicación que se le iba a dar al alginato, era importante obtener una alta razón G/M. Este es uno de los parámetros que va a determinar las características del hidrogel generado, ya que el hidrogel se produce por la unión del calcio a los residuos de ácido gulurónico en la cadena (Ching et al., 2017). Estudios realizados en alginato proveniente de alga demostraron que una mayor proporción G/M en la cadena de alginato permite elaborar hidrogeles de alginato con un mayor módulo de Young, traducándose en geles más resistentes (Aarstad et al., 2017; Donati et al., 2005; Skjåk-Bræk et al., 1989).

Finalmente, se caracterizó el alginato extraído por el grado de acetilación, observándose que éste el mayor valor fue a 500 rpm produciendo un alginato con un grado de acetilación de  $4,7 \pm 0,1$  % p p<sup>-1</sup>. Este valor, se encuentra en el rango de valores de acetilación descritos previamente que van desde 1 al 7% en biorreactores, siendo todos estos estudios con control de TOD (Castillo, et al., 2013; Díaz-Barrera et al., 2017; Peña et al., 2002). Es importante destacar que el grado de acetilación a 100, 700 y 900 rpm no había sido evaluada. En cultivos en matraces se ha evidenciado que a una mayor VTO se produce una disminución del grado de acetilación, inversamente a lo que ocurría con la razón G/M (Peña

et al., 2011). La acetilación se produce en la cadena nascente de ácido polimanurónico y posteriormente los residuos de ácido manurónico que no fueron acetilados pueden ser epimerizados a ácido gulurónico (Urtuvia et al., 2017). Por lo tanto, se esperaba que un alginato con una alta razón G/M posea valores más bajos de acetilación que uno con una baja razón G/M y en este trabajo la razón G/M obtenida es mayor a las reportadas previamente. La acetilación del alginato se relaciona directamente con la capacidad de retención de agua del hidrogel formado, evidenciándose que a un mayor porcentaje de acetilación aumenta la capacidad de retención de agua, pero la rigidez del gel se ve disminuida (Aarstad et al., 2019; Skjåk-Bræk et al., 1989). Por tanto, es un parámetro para tener en consideración dependiendo de la aplicación final que quiera darse al hidrogel de alginato.

Posterior a su caracterización, los alginatos bacterianos se clasificaron en tres categorías según su peso molecular promedio (PMP): bajo peso molecular (LMW) (entre 90 - 160 kDa), medio peso molecular (MMW) (entre 300 - 350 kDa) y alto peso molecular (HMW) (entre 550 - 660 kDa). Estas categorías de alginatos se utilizaron para preparar hidrogeles mediante reticulación iónica con una solución de  $\text{CaCl}_2$  al 2 % p v<sup>-1</sup> durante 3 h en un sonicador para obtener una buena homogeneización. Solo los hidrogeles con formación estable de la matriz tridimensional se seleccionaron para las siguientes pruebas. La formación de los hidrogeles de alginato se llevó a cabo utilizando una masa de alginato seco de 10 mg. La Figura 8.6 ilustra la preparación de estos hidrogeles de alginato bacteriano, con experimentos realizados por sextuplicado para cada tipo de alginato.

Como se observa en la Figura 8.6, la formación de hidrogeles dependió críticamente del peso molecular del alginato. Para el alginato LMW, no se apreció la formación de una estructura de hidrogel cohesiva, lo que sugiere una incapacidad para establecer una red reticulada estable bajo estas condiciones. Por el contrario, tanto en las categorías de MMW como de HMW, hubo formación de hidrogeles de alginato bacteriano. Este resultado indica que los alginatos con pesos moleculares en los rangos MMW y HMW son adecuados para la formación de hidrogeles estables mediante reticulación iónica (Hu et al., 2022).

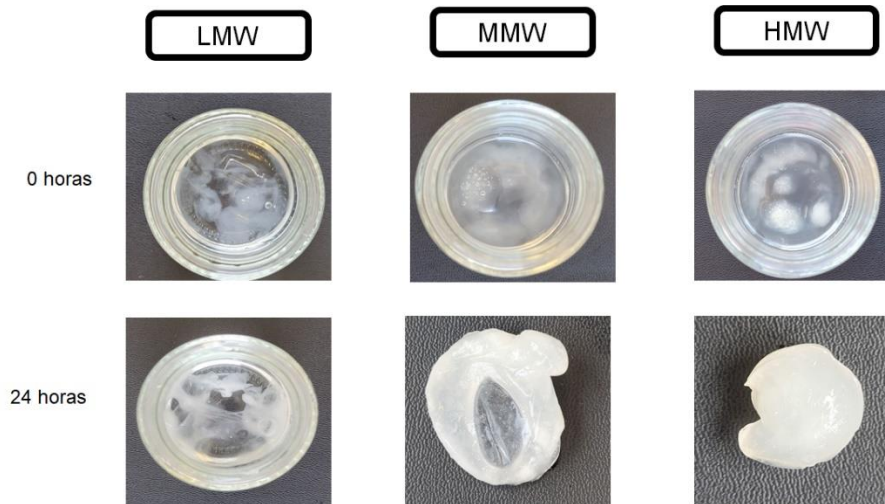


**Figura 8.6.** Formación de hidrogeles de alginato bacteriano.

Al comparar nuestros resultados con la literatura, Barba et al., (2014) investigaron mezclas de alginato/Pluronic (F127) para aplicaciones biomédicas. El Pluronic, un copolímero tribloque anfifílico no iónico con un núcleo de poli (óxido de propileno) (PPO) rodeado por cadenas de poli (óxido de etileno) (PEO), se mezcló con dos tipos de alginato de sodio al 2% ( $p v^{-1}$ ) (396 y 419 kDa). Estudiaron la cinética de reticulación de estas mezclas usando  $Cu^{+2}$  como agente. Sus hallazgos indicaron que la cinética de reticulación fue más rápida con este agente, y que la combinación de alginato con otro copolímero podría generar geles con mayor capacidad de moldeado, útiles como stents liberadores de fármacos en el campo de la biomedicina.

La Figura 8.7 presenta la formación de hidrogeles de alginato bacteriano bajo las mismas condiciones experimentales previas, con la diferencia de que se incrementó la masa de alginato seco a 100 mg para cada una de las categorías de peso molecular establecidas (LMW, MMW y HMW). Al aumentar la concentración de alginato, el alginato de LMW no mostró formación de hidrogel cohesivo tras 24 h de reticulación iónica a temperatura ambiente, lo que reitera su incapacidad para formar una red polimérica estable bajo estas condiciones. Por otra parte, en la categoría de MMW, se logró la formación de un hidrogel. Si bien su morfología no es completamente uniforme, la estructura se mantuvo intacta durante las 24 h de observación a temperatura ambiente. Finalmente, el alginato de HMW resultó en la formación de un hidrogel de alginato bacteriano con una morfología uniforme y una excelente estabilidad, manteniendo su conformación original inalterada durante el mismo período de 24 h a temperatura ambiente. Estos resultados refuerzan la correlación directa entre el peso molecular del alginato bacteriano y su capacidad para formar hidrogeles

estables mediante reticulación iónica, especialmente al aumentar la concentración del polímero.

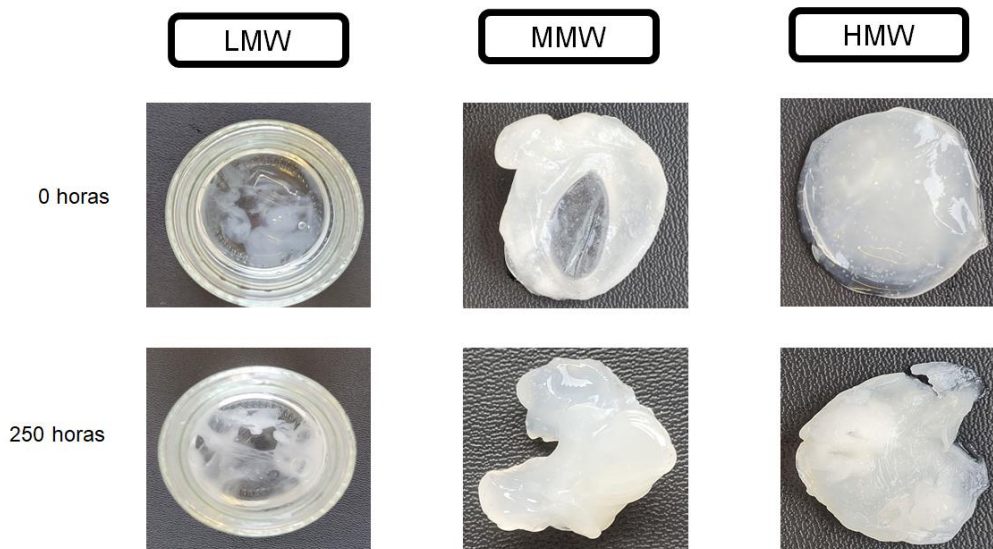


**Figura 8.7** Formación de hidrogeles de alginato bacteriano luego de 24 h de reticulación iónica.

Es posible que a utilizando un alginato LMW no haya habido formación de hidrogel debido al bajo PM en comparación con el obtenido en otras condiciones, ya que se han reportado pesos moleculares superiores a 600-3000 kDa para aplicaciones biomédica. En el área biomédica, para hidrogel para adhesión de mioblastos y apósitos para heridas, se requiere una relación G/M de 0,42 a 1,5 y un grado de acetilación de alrededor del 5% se puede decir que estos parámetros no afectan la formación del hidrogel (Ahmad Raus et al., 2021b; Szekalska et al., 2016b; Caccavo et al., 2015; Hofer et al., 2015).

### 8.2.3. Pruebas de estabilidad de los hidrogeles de alginato bacteriano

Se realizaron pruebas de estabilidad hidráulica de los hidrogeles seleccionados, mediante 25 ciclos de hidratación y deshidratación en agua desionizada y deshidratación a temperatura ambiente durante 250 horas, las cuales se muestran a continuación en la figura 8.8.



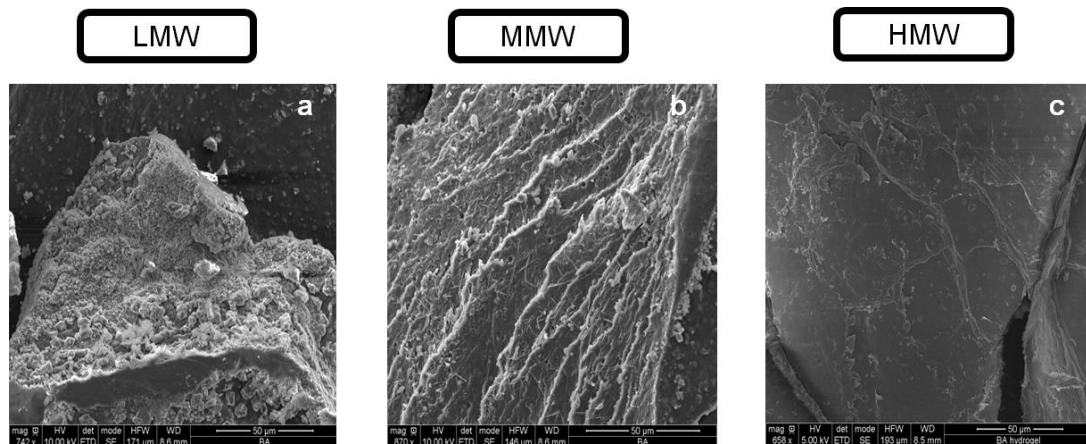
**Figura 8.8** Estabilidad hidráulica de hidrogeles de alginato bacteriano luego de 250 horas.

De la figura 8.8 se desprende que, a las 0 horas, se observa que solo los alginatos MMW y HMW son capaces de formar hidrogeles cohesivos y bien definidos, lo que confirma la eficacia del  $\text{Ca}^{+2}$  para reticular sus cadenas poliméricas y crear una red tridimensional estable mediante el modelo de "caja de huevos". Por el contrario, el alginato LMW no forma una estructura de gel, manteniéndose disperso en la solución, lo que sugiere que sus cadenas son demasiado cortas o insuficientes para establecer una red reticulada robusta con el  $\text{Ca}^{+2}$ .

Luego de 250 horas y realizando ciclos de estabilidad hidráulica, el hidrogel MMW evidencia una clara deformación mayor y pérdida de su forma inicial en comparación con el hidrogel HMW, logran mantener su integridad como geles, sin desintegrarse por completo. Esta resiliencia indica una resistencia significativa de las uniones iónicas entre el  $\text{Ca}^{+2}$  y el alginato. En contraste, el LMW permanece inalterado en su estado disperso, reafirmando su falta de estabilidad estructural inicial. Estos resultados resaltan la importancia del peso molecular del alginato bacteriano en la formación de hidrogeles estables y en su capacidad para soportar condiciones ambientales fluctuantes, un aspecto fundamental para su aplicación en campos biomédicos y de ingeniería de tejidos (Bhujbal et al., 2014; K. Y. Lee & Mooney, 2012b; Bhattarai & Zhang, 2007).

#### 8.2.4. Análisis de los alginatos e hidrogeles por microscopía electrónica de barrido (SEM):

La microestructura de los alginatos bacterianos, influenciada por su peso molecular, fue caracterizada mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), como se muestra en la Figura 8.9.

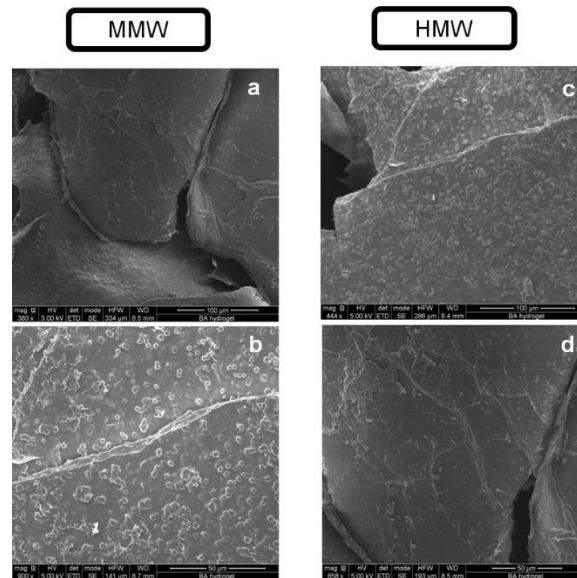


**Figura 8.9** Microscopia electrónica de barrido (SEM) de alginatos bacterianos, peso molecular bajo (LMW) (a) peso molecular medio (MMW) (b) y peso molecular alto (HMW) (c).

En la Figura 8.9a se observa la micrografía correspondiente al alginato LMW que exhibe una superficie predominantemente granular y porosa, con agregados de partículas irregulares y falta de una estructura de red continua. Esta morfología granular y la ausencia de una topografía fibrosa o laminar característica de un gel reticulado explican la incapacidad del LMW para formar un hidrogel estable, incluso a concentraciones elevadas, confirmando que las cadenas de bajo peso molecular no logran establecer suficientes puntos de reticulación iónica con  $\text{Ca}^{+2}$  para generar una red tridimensional cohesiva (Segale et al., 2016; Potter et al., 1994).

La Figura 8.9b corresponde a una micrografía de alginato MMW, el cual revela una superficie con una topografía ondulada y estriada, sugiriendo la presencia de capas o pliegues interconectados que forman una red relativamente densa, consistente con la formación de un gel cohesivo observado macroscópicamente. En contraste, la Figura 8.9c del alginato HMW presenta una superficie más lisa y homogénea, aunque con algunas fracturas o grietas dispersas, lo que podría indicar una estructura más compacta y uniforme, en línea con la mayor estabilidad y la morfología más definida de los hidrogeles HMW.

La Figura 8.10 presenta las micrográficas obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) de los hidrogeles de alginato bacteriano con pesos moleculares medio (MMW) y alto (HMW) después de haber sido sometidos a 250 horas de prueba de estabilidad hidráulica, que incluyó 20 ciclos de hidratación y deshidratación.



**Figura 8.10** Microscopía electrónica de barrido (SEM) de los hidrogeles de alginato bacteriano sometidos a pruebas de estabilidad hidráulica a 100 y 50  $\mu\text{m}$ . peso molecular medio (MMW) (a y b) y peso molecular alto (HMW) (c y d).

En el caso del alginato MMW (Fig. 8.10 a y b), la microestructura revela una superficie con extensas grietas y una apariencia más fragmentada y rugosa en comparación con su estado inicial. A una mayor magnificación (b), se observan numerosas estructuras puntiformes o poros, así como una evidente reorganización de la matriz polimérica. Esta morfología alterada es consistente con la deformación y la pérdida de uniformidad macroscópica observadas en el hidrogel MMW tras el ensayo de estabilidad hidráulica (Baysal et al., 2013).

Algo similar ocurre con el alginato HMW (Figura 8.10 c y d), las micrográficas post-ensayo muestran una superficie con fisuras pronunciadas y una textura menos lisa y más granular en comparación con su microestructura homogénea inicial. Aunque el hidrogel HMW mantuvo mejor su conformación macroscópica general que el MMW después de las 250 h, la evidencia a nivel microscópico sugiere que la exposición prolongada a los ciclos de hidratación y deshidratación ha provocado estrés en la red del polímero. Las grietas y la apariencia más rugosa en ambas categorías MMW y HMW indican una posible reorganización de las interacciones iónicas, lo que conduce a una contracción o colapso parcial de la red del

hidrogel, incluso si la integridad global se mantiene. Estos cambios microestructurales explican la deformación macroscópica y la reducción de la cohesión observadas tras las rigurosas pruebas de estabilidad (Aston et al., 2016).

En síntesis, estos resultados muestran que el peso molecular del alginato bacteriano es el factor primordial que determina la viabilidad de la formación de hidrogeles estables mediante reticulación iónica con  $\text{Ca}^{+2}$ , así como su resistencia a la degradación microestructural y la deformación macroscópica bajo condiciones de estrés hidráulico. La capacidad de los alginatos de alto peso molecular para formar redes más robustas es esencial para aplicaciones que demandan estabilidad estructural y durabilidad en entornos líquidos dinámicos, como las aplicaciones biomédicas.

### **8.3. Expresión relativa de genes involucrados en la producción de alginato**

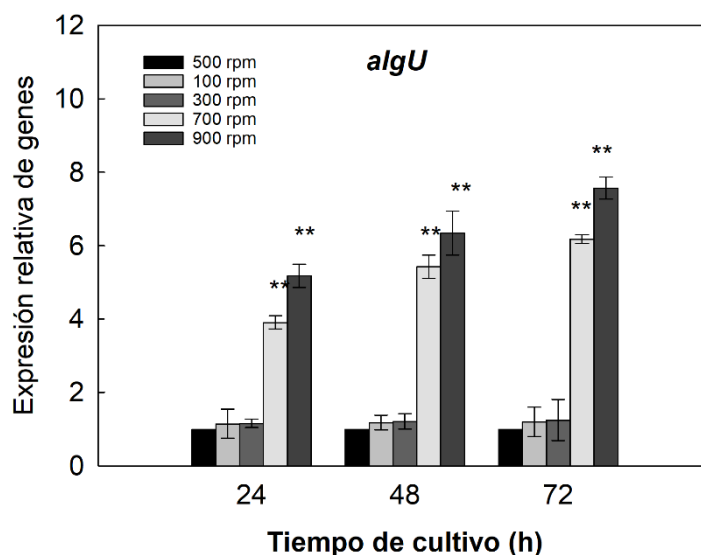
Para una mejor comprensión de los resultados obtenidos en la determinación y caracterización del alginato bacteriano producido por *A. vinelandii* a diferentes velocidades de agitación, se investigó la expresión relativa de los genes implicados en la biosíntesis de alginato bajo diversas condiciones de cultivo. A continuación, se muestran las expresiones génicas relativas de los genes relacionados con la biosíntesis de alginato, fijación de nitrógeno, respiración y estrés celular, cuantificados en las siguientes etapas del cultivo: fase de crecimiento celular (24 h), fase pre-estacionaria (48 h) y fase estacionaria (72 h)

#### **8.3.1. Genes relacionados con la regulación global de la biosíntesis del alginato *algU* en cultivos por lotes de *A. vinelandii* ATCC 9046**

En la figura 8.11 se muestra la expresión del gen *algU*, un reconocido regulador global involucrado en la síntesis de alginato y en *A. vinelandii*. Dado su rol como factor sigma alternativo, *AlgU* coordina la expresión de múltiples genes asociados a la biosíntesis de alginato y a mecanismos de adaptación celular (Chowdhury-Paul et al., 2023; Martínez-Salazar et al., 1996).

En la Figura 8.11 se muestra que, durante la fase de crecimiento celular, la transcripción de *algU* a bajas velocidades de agitación no fue significativa respecto del control, pero al aumentar a 700 y 900 rpm aumentó aproximadamente 3 y 5 veces. En la fase pre-estacionaria (48 h) hubo una expresión relativa de *algU* no significativa a 100 y 300 rpm, pero

si a altas velocidades de agitación entre 5 y 6 veces más respecto de 500 rpm. A las 72 h de cultivo, bajo las mismas condiciones, a velocidades de agitación más bajas (100 y 300 rpm), los niveles de transcripción son similares al control, pero a 700 y 900 rpm la expresión relativa de genes fue de 6 y 8 veces más respecto a 500 rpm.



**Figura 8.11** Perfil de expresión relativa de genes involucrados en la regulación global de la biosíntesis de alginato (*algU*), a diferentes tiempos de cultivos (24, 48 y 72 h) en cultivos por lotes de *A. vinelandii* ATCC 9046 a diferentes velocidades de agitación.

El nivel de los transcritos de *algU* se normalizó de acuerdo con el nivel del ARNm de *gyrA* como se describe en la Sección Materiales y métodos. Los datos se presentan como cambios en el pliegue con respecto al valor del calibrador (condición de 500 rpm). Los valores corresponden a promedios de tres réplicas independientes  $\pm$  desviación estándar. Las diferencias entre condiciones fueron evaluadas mediante análisis de varianza unidireccional (ANOVA). Se consideraron estadísticamente significativas según el siguiente criterio: \*  $P < 0,05$  (significativo), \*\*  $P < 0,01$  (muy significativo), \*\*\*  $P < 0,001$  (altamente significativo).

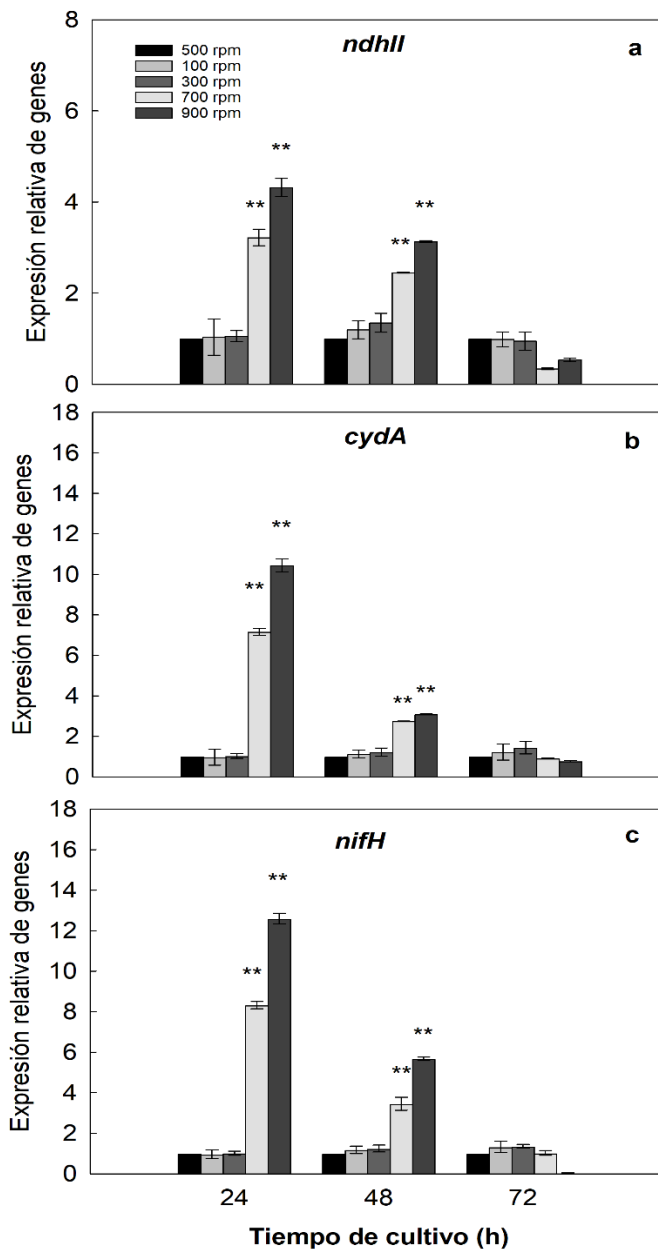
Cabe destacar que es primera vez que se realiza el estudio de la expresión relativa del gen *algU*. Los antecedentes más recién son del estudio de Castillo et al., (2018) quienes demostraron que, el factor sigma E (AlgU) en *A. vinelandii* en una bacteria *que* no produce alginato y carece del factor sigma E (*algU*<sup>-</sup>) y una bacteria productora de polímero (*algU*<sup>+</sup>) en condiciones diazotróficas y con diferentes condiciones de aireación. Ellos demostraron que bajo condiciones diazotróficas y de alta aireación, la bacteria OP (*algU*<sup>-</sup>) tuvo una  $qO_2$  mayor (30 y 54%) que las observadas en *A. Vinelandii* OP complementada con *algU*<sup>+</sup>, denominada OPAIgU<sup>+</sup>, y ATCC 9046 respectivamente. Sin embargo, la  $qO_2$  y los rendimientos de biomasa

(basados en oxígeno y sacarosa) fueron menores para los cultivos de OP en comparación con la bacteria *A. vinelandii algU+*.

La velocidad de agitación podría ser un factor importante en la producción de alginato la cual se ve reflejada en la expresión relativa del gen *algU* impactando la  $qO_2$ . Como se ha descrito anteriormente, 700 y 900 rpm, fue observada una producción de alginato máxima referente a las otras condiciones, cercano a los  $5,3 \pm 0,1 \text{ g L}^{-1}$  a las 48 h de cultivo, y eso se correlaciona con el incremento de la expresión transcripcional de *algU* (5 - 8 veces más que el control) y una alta  $qO_2$  ( $45,3 \pm 2,0 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  inicialmente). Se ha reportado que un alto valor de  $qO_2$  posee una mayor actividad del ciclo TCA, generando la energía necesaria para la biosíntesis del alginato. Sin embargo, se ha descrito previamente que el acetil-CoA puede ir dirigido a la síntesis de PHB, explicando la menor acumulación de PHB observada. Por otra parte, a 100 rpm la producción de alginato fue de  $2,9 \pm 0,1 \text{ g L}^{-1}$  y la  $qO_2$  fue menor de  $14,9 \pm 0,8 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  lo que podría indicar una actividad metabólica menor. Estos resultados resaltan la regulación coordinada de la expresión de *algU*, el metabolismo energético y la producción de alginato, donde la velocidad de agitación actúa como un parámetro crítico para optimizar la biosíntesis del biopolímero.

### **8.3.2. Expresión relativa de genes implicados en la respiración desacoplada y en la fijación de nitrógeno en cultivos por lotes *A. vinelandii* ATCC 9046**

La Figura 8.12a muestra la expresión génica de *ndhII* a lo largo del cultivo. Inicialmente, durante la fase de crecimiento celular (24 h de cultivo), la transcripción de *ndhII* se mantuvo similar a la observada a las 8 h a bajas velocidades de agitación, pero se incrementó significativamente a 700 y 900 rpm, alcanzando valores de 3,2 y 4,3 veces respectivamente. En la fase preestacionaria (48 h), los niveles de transcripción se mantuvieron constantes a 100 y 300 rpm, mientras que a 700 y 900 rpm disminuyeron en comparación con las 24 h. Finalmente, en la fase estacionaria (72 h), la transcripción de *ndhII* no mostró una expresión significativa respecto al control.



**Figura 8.12** Perfil de expresión relativa de genes involucrados en la respiración y fijación de nitrógeno a diferentes tiempos de cultivos (24, 48 y 72 h) en cultivos por lotes de *A. vinelandii* a diferentes velocidades de agitación.

El nivel de los transcritos de *nifH*, *cydA* y *ndhII* se normalizaron de acuerdo con el nivel del ARNm de *gyrA* como se describe en la Sección Materiales y métodos. Los datos se presentan como cambios en el pliegue con respecto al valor del calibrador (condición de 500 rpm). Los valores corresponden a promedios de tres réplicas independientes  $\pm$  desviación estándar. Las diferencias entre condiciones fueron evaluadas mediante análisis de varianza unidireccional (ANOVA). Se consideraron estadísticamente significativas según el siguiente criterio: \*  $P < 0,05$  (significativo), \*\*  $P < 0,01$  (muy significativo), \*\*\*  $P < 0,001$  (altamente significativo).

La Figura 8.12b muestra la expresión relativa del gen *cydA* a lo largo del cultivo. A las 24 h de cultivo, la transcripción de *cydA* se mantuvo similar a la observada a las 8 h a bajas velocidades de agitación, pero se incrementó significativamente a 700 y 900 rpm, alcanzando valores de 7 y 10 veces respecto del control. En la fase pre-estacionaria (48 h), los niveles de transcripción se mantuvieron constantes a 100 y 300 rpm, mientras que a 700 y 900 rpm disminuyeron en comparación con las 24 h. Finalmente, en la fase estacionaria (72 h), la transcripción de *cydA* no mostró una expresión significativa respecto al control.

Castillo et al., (2018), por otra parte, estudiaron en matraces la actividad respiratoria de una bacteria de *A. vinelandii* que no produce alginato y carece del factor sigma E (*algU*-) y una bacteria productora de alginato (*algU*+) en condiciones diazotróficas y con diferentes condiciones de aireación. Ellos determinaron, la expresión génica de *cydA* y *ndhII*, a una  $VCO_{m\acute{a}x}$  de  $29 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , la expresión de *cydA* fue mayor en la bacteria OP (1,5 veces) que en su derivado OP*AlgU*+; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la expresión de *ndhII* entre ambas bacterias. Además de su participación en la regulación de la biosíntesis de alginato, AlgU es un regulador transcripcional involucrado en diversas respuestas metabólicas y fisiológicas; una de las más importantes es la regulación de la expresión de CydR (León & Espín, 2008; Setubal et al., 2009), que a su vez regula negativamente los citocromos bd (*cydA* y *cydB*), así como la expresión de la oxidorreductasa NADII (Wu et al., 2000). Ambas proteínas participan en el mecanismo de protección respiratoria presente en las células de *A. vinelandii* cuando se exponen a altas concentraciones de oxígeno mientras fijan nitrógeno. Para comprender si la ausencia de AlgU en la *A. vinelandii* OP influyó en la expresión génica de *cydA* y *ndhII*, se evaluó la cantidad relativa de transcritos de estos genes en las *A. vinelandii* OP y su derivado *AlgU*+ cultivadas a altas VTO. Contrariamente a lo esperado, no se encontraron diferencias significativas en la expresión génica relativa de *ndhII* entre las bacterias que fueron evaluadas. Sin embargo, en el caso del gen *cydA* (que codifica el citocromo b), se encontraron diferencias importantes, determinando la mayor expresión relativa de este gen en la bacteria OP. Para esta bacteria, la expresión génica relativa de *cydA* fue 1,5 veces mayor que en su derivado OP*AlgU*+, lo que sugiere que el alto  $qO_{2m\acute{a}x}$  alcanzado con la bacteria OP, principalmente en los cultivos realizados con altas concentraciones de oxígeno, podría explicarse parcialmente por la falta de AlgU y su papel en la regulación negativa de la expresión de *cydAB* (Wu et al., 2000).

García et al., (2018) analizaron el flujo metabólico a través del metabolismo central del carbono y la respiración en cultivos de *A. vinelandii* en quimiostatos a una D de  $0,08 \text{ h}^{-1}$  y a diferentes velocidades de agitación 300, 500 y 700 rpm. Ellos observaron que, en cultivo a una alta VTO  $14,3 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , donde el rendimiento proteico fue menor (menor crecimiento

celular), transcripción de genes que codifican componentes de la cadena respiratoria desacoplada (*cydA* y *ndhII*) fueron inducidos significativamente con respecto a los cultivos desarrollados en condiciones limitantes de oxígeno. La expresión relativa de *cydA* aumentó un 30% cuando la VTO fue de  $6,2 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  con respecto a  $2,4 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ; Sin embargo, se observó una inducción aún mayor a  $14,3 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (2,3 veces). Para el gen *ndhII*, la expresión relativa también se indujo considerablemente (3,5 veces) a una VTO más alta de  $14,3 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  en comparación con los cultivos desarrollados a  $6,2 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (condición de referencia). Estos resultados se correlacionan con los nuestros, indicando que, a una VTO de  $14,3 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , se observa una alta expresión de la cadena respiratoria alternativa, un mecanismo clave para la protección de la nitrogenasa.

Por otra parte, (Liu et al., (2014) estudiaron el incremento de la producción mejorada de PHB en *Escherichia coli* mediante la inactivación de la citocromo bd-II oxidasa o/y la NDH-II deshidrogenasa en cultivo en matraces. Ellos demostraron que, la inactivación del citocromo bd-II oxidasa y/o la NDH-II deshidrogenasa resultó en un aumento significativo de la producción de PHB en *E. coli* recombinante, lo cual puede atribuirse al aumento del aporte intercelular de acetil-CoA y NAD(P)H. La inactivación de la NDH-II deshidrogenasa es eficaz para la sobreproducción de PHB mediante la ingeniería metabólica de las cadenas respiratorias aeróbicas. Al relacionar este estudio con trabajo, podemos decir que a 700 y 900 rpm la producción de PHB es baja, lo que conlleva tener una mayor expresión de los genes relacionados a la respiración desacoplada.

En la Figura 8.12c se muestran los niveles de transcripción de *nifH*, donde a las 24 h de cultivo, la transcripción de *nifH* a 100 y 300 rpm fue similar al control. A 700 rpm, la transcripción aumentó 8 veces en comparación con 500 rpm, y a 900 rpm, aumentó 12 veces. Durante la fase preestacionaria (48 h), la expresión relativa de *nifH* fue similar para 100 y 300 rpm, sin embargo, a altas velocidades de agitación su expresión disminuyó a 3 veces a 700 rpm y 6 veces a 900 rpm. Finalmente, a las 72 h de cultivo, los niveles de *nifH* no fueron estadísticamente significativos a las velocidades de agitación.

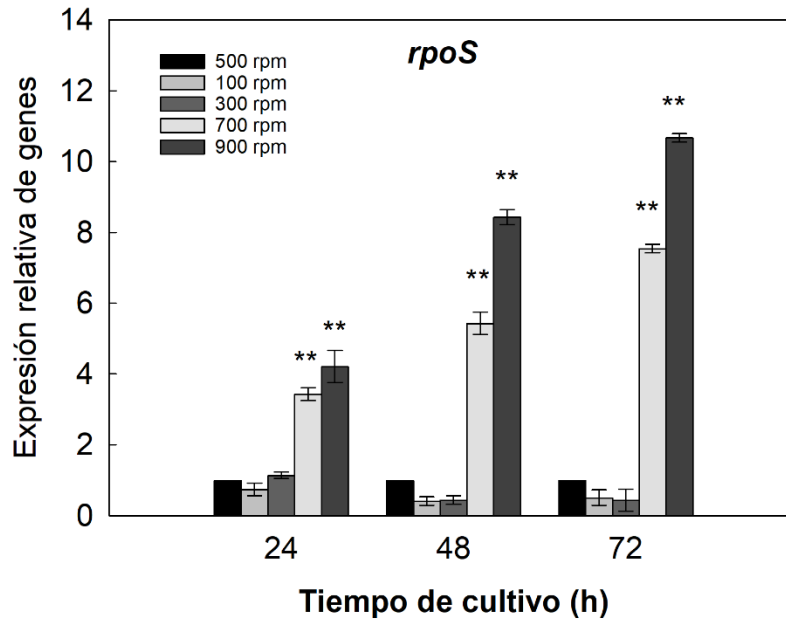
García et al., (2018), analizaron el flujo metabólico a través del metabolismo central del carbono y la respiración en cultivos de *A. vinelandii* en cultivo continuo a una D de  $0.08 \text{ h}^{-1}$ , con amonio y a diferentes velocidades de agitación 300, 500 y 700 rpm. Ellos determinaron el nivel de expresión de la nitrogenasa y fue observado un aumento de 23 veces en los cultivos a altas velocidades de agitación (700 rpm). Ellos expresaron que, los cultivos a una VTO alta se encontraban fijando nitrógeno atmosférico dada la limitación de  $\text{NH}_3$ , sugiriendo

que *A. vinelandii* responde al agotamiento de nitrógeno induciendo la expresión de la nitrogenasa.

Respecto de nuestros resultados, la velocidad de agitación es un factor regulador crítico de la expresión del gen *nifH*, el cual es imprescindible en la fase de crecimiento de cultivos de *A. vinelandii*. La velocidad de agitación emerge como un factor regulador crítico de la expresión del gen *nifH*, un componente esencial de la nitrogenasa, en cultivos de *A. vinelandii*. Durante la fase de crecimiento temprano (24 h), se observa un aumento significativo en la transcripción de *nifH* a altas velocidades de agitación. Este hallazgo coincide con el estudio de García et al., (2018), sugiriendo que la limitación de amonio inducida por la alta aireación favorece la fijación de nitrógeno. Sin embargo, en fases posteriores del cultivo (48 y 72 h), la expresión de *nifH* disminuye significativamente, lo que indica una regulación temporal de la fijación de nitrógeno. Estos resultados resaltan la compleja interacción entre la velocidad de agitación, la disponibilidad de nitrógeno y la expresión de genes clave para la fijación de nitrógeno en *A. vinelandii*.

Respecto de los resultados obtenidos en la respiración, se puede indicar que, la respiración desacoplada es un mecanismo de protección esencial para la nitrogenasa en *A. vinelandii*. La expresión del gen *nifH* y la fijación de nitrógeno están estrechamente relacionadas con la respiración desacoplada. Esta regulación de la expresión de *nifH* por la velocidad de agitación y la disponibilidad de nitrógeno refleja la adaptación de *A. vinelandii* a diferentes condiciones ambientales, donde la respiración desacoplada juega un papel fundamental en la protección de la nitrogenasa.

### 8.3.3. Expresión relativa de genes implicados en el estrés celular en *A. vinelandii*



**Figura 8.13** Perfil de expresión relativa de genes involucrados en el estrés celular (*rpoS*), a diferentes tiempos de cultivos (24, 48 y 72 h) en cultivos por lotes de *A. vinelandii* a diferentes velocidades de agitación.

El nivel de los transcritos de *rpoS* se normalizó de acuerdo con el nivel del ARNm de *gyrA* como se describe en la Sección Materiales y métodos. Los datos se presentan como cambios en el pliegue con respecto al valor del calibrador (condición de 500 rpm). Los valores corresponden a promedios de tres réplicas independientes  $\pm$  desviación estándar. Las diferencias entre condiciones fueron evaluadas mediante análisis de varianza unidireccional (ANOVA). Se consideraron estadísticamente significativas según el siguiente criterio: \*  $P < 0,05$  (significativo), \*\*  $P < 0,01$  (muy significativo), \*\*\*  $P < 0,001$  (altamente significativo).

La Figura 8.13 muestra la expresión relativa del gen *rpoS* en función de las velocidades de agitación y los tiempos de cultivo. A las 24 horas, se detectó un aumento en los niveles de transcripción de *rpoS* a 700 y 900 rpm, alcanzando cerca de cuatro veces los valores observados a 500 rpm. Durante la fase pre-estacionaria, este aumento fue aún más pronunciado, con niveles de expresión relativa entre seis y ocho veces superiores a altas velocidades de agitación. Finalmente, en la fase estacionaria, se registró un incremento significativo de ocho a doce veces respecto del control.

Estos hallazgos contrastan con lo descrito previamente en cultivos de *E. coli*, donde la expresión de RpoS se asocia primariamente con el agotamiento de nutrientes específicos y

la respuesta al estrés, con una disminución a niveles basales una vez que el estrés cesa (Hengge, 2008, 2008; Pruteanu & Hengge-Aronis, 2002; Loewen et al., 1998). Es importante señalar que la expresión de *rpoS* en el contexto de un crecimiento diazotrófico, como el de *A. vinelandii*, no ha sido ampliamente estudiada.

Nuestros resultados son consistentes con el estudio de Sandercock & Page, (2008) quienes investigaron la expresión de RpoS y la respuesta general al estrés en *A. vinelandii* durante cambios en las fuentes de carbono y nitrógeno. Utilizando una bacteria no productora de alginato (*A. vinelandii* UW) y una bacteria mutante *rpoS* cultivadas en matraz y biorreactor con amonio, determinaron que la expresión de RpoS, tanto a nivel transcripcional como postraduccional, está influenciada por las variaciones en estas fuentes nutricionales, siendo crucial para la supervivencia en ambientes adversos. Descubrieron que la bacteria mutante *rpoS* mostró una menor supervivencia frente al estrés en fase estacionaria en comparación con el tipo silvestre. Cabe destacar que, en su estudio, la expresión de RpoS no fue exclusiva de la fase estacionaria y se vio influenciada por cambios en carbono y nitrógeno (con aumentos de hasta 28 veces), sin que hubiera una variación en la disponibilidad de oxígeno en el sistema.

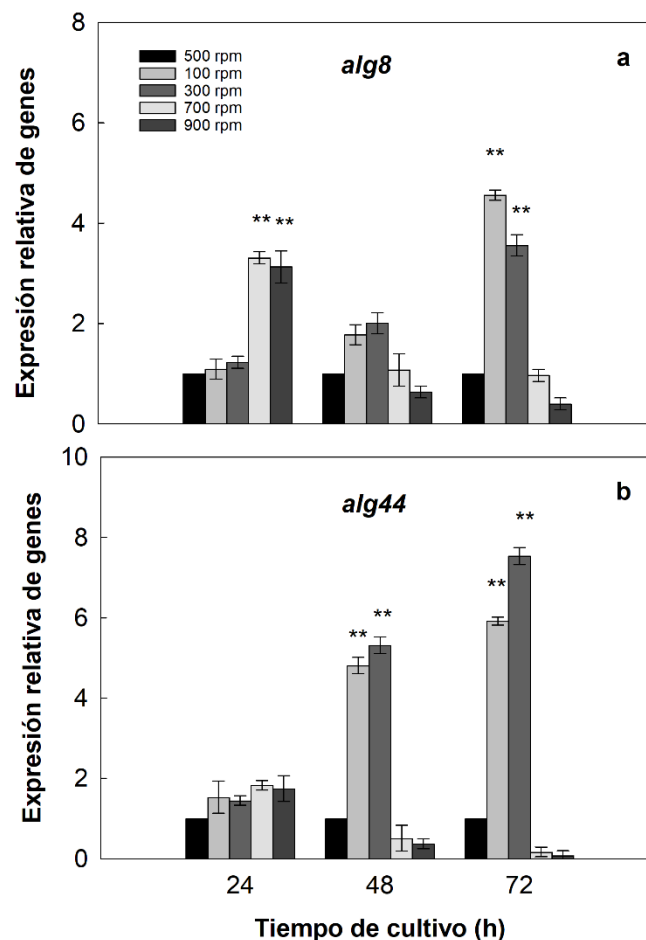
Se ha determinado que en *A. vinelandii*, la expresión del gen *rpoS* aumenta significativamente a altas velocidades de agitación (700 y 900 rpm). En estas condiciones, el oxígeno disuelto juega un rol principal en la modulación de la producción de alginato, generando que algunos genes directamente relacionados con su biosíntesis y modificación se vean afectados simultáneamente por la agitación y, por consecuencia, por la disponibilidad de oxígeno. Esta interacción entre el estrés por variabilidad de oxígeno (señalizado por *rpoS*) y la maquinaria de biosíntesis del alginato sugiere que *A. vinelandii* podría ajustar la calidad y cantidad del alginato producido como parte de su respuesta fisiológica al entorno del biorreactor, lo cual es fundamental para la supervivencia celular y, en última instancia, para la modulación de las propiedades del alginato en los diferentes tiempos de cultivo.

#### **8.3.4. Genes involucrados en la polimerización del alginato: *alg8* y *alg44***

La Figura 8.14 muestra la expresión relativa del gen *alg8*, responsable de codificar la proteína glicosiltransferasa Alg8, y del gen *alg44*, que codifica la proteína copolimerasa Alg44 a diferentes tiempos de cultivo y velocidades de agitación. En la Figura 8.14a se muestra que, a las 24 h de cultivo, la transcripción de *alg8* aumentó aproximadamente 3,3 veces en comparación con el control a 700 y 900 rpm, a medida que aumentó el tiempo del cultivo los niveles transcripcionales fueron más bajos en las fases pre-estacionaria (48 h) y estacionaria

(72 h) bajo las mismas condiciones. Por otro lado, a velocidades de agitación más bajas (100 y 300 rpm), los niveles de transcripción aumentaron alrededor de dos veces respecto al control a las 48 h de cultivo, y en la fase estacionaria (72 h), estos niveles fueron aproximadamente 5 veces mayores a 100 rpm y 4 veces mayores a 300 rpm.

En la Figura 8.14b se presenta la expresión génica de *alg44*. Durante la fase de crecimiento (24 h), la transcripción de *alg44* se duplicó en comparación con el control a todas las velocidades de agitación. En la fase pre-estacionaria (48 h), los niveles de transcripción aumentaron aproximadamente cinco veces a 100 y 300 rpm, mientras que a 700 y 900 rpm fueron más bajos. En la fase estacionaria (72 h), la transcripción fue de 5 a 7 veces mayor a bajas velocidades de agitación (100 y 300 rpm), mientras que a 700 y 900 rpm se mantuvo similar a los niveles observados a las 48 h de cultivo.



**Figura 8.14** Perfiles de expresión relativa de genes involucrados en la polimerización (*alg8* (a) y *alg44* (b)), a diferentes tiempos de cultivos (24, 48 y 72 h) en cultivos por lotes de *A. vinelandii* a diferentes velocidades de agitación.

El nivel de los transcritos de *alg8* y *alg44* se normalizó de acuerdo con el nivel del ARNm de *gyrA* como se describe en la Sección Materiales y métodos. Los datos se presentan como cambios en el pliegue con respecto al valor del calibrador (condición de 500 rpm). Los valores corresponden a promedios de tres réplicas independientes  $\pm$  desviación estándar. Las diferencias entre condiciones fueron evaluadas mediante análisis de varianza unidireccional (ANOVA). Se consideraron estadísticamente significativas según el siguiente criterio: \*  $P < 0,05$  (significativo), \*\*  $P < 0,01$  (muy significativo), \*\*\*  $P < 0,001$  (altamente significativo).

En relación con los resultados obtenidos, Díaz-Barrera et al., (2011) demostraron que, en cultivos continuos a una misma velocidad de dilución ( $D = 0,8 \text{ h}^{-1}$ ), la expresión del gen *alg8* se encontraba relacionada con la VTO. Específicamente, un aumento en la VTO generaba una disminución en la expresión de *alg8*. En contraste, Ponce et al., (2021), en cultivos por lotes a una VTO controlada y no controlada, observaron que, a las 24 h, la expresión transcripcional de *alg8* fue 1,7 veces mayor a una VTO controlada, mientras que en la fase estacionaria tuvo una disminución respecto del control. Estos resultados podrían indicar que el rol del gen *alg8* está más relacionado con su activación en la fase del cultivo que con los cambios en la VTO por la velocidad de agitación.

Por otro lado, Ponce et al., (2021) en cultivo por lotes de *A. vinelandii* ATCC 9046 observaron que los niveles de transcripción de *alg44* fueron menores a una VTO controlada. Luego de 30 h de cultivo, se observó una disminución en el PMP del alginato obtenido a una VTO controlada lo que se correlaciona con la disminución de la expresión relativa del gen *alg44* sugiriendo que a una alta VTO existe una baja actividad de la copolimerasa.

Al realizar un análisis entre los perfiles de PMP de alginato y la expresión de estos genes involucrados en la polimerización del alginato a las diferentes velocidades de agitación. La expresión del gen *alg8*, este se ve afectado por la velocidad de agitación. A bajas velocidades de agitación entre 100 y 300 rpm, la transcripción de *alg8* se incrementa, favoreciendo la producción de alginato de mayor peso molecular, probablemente debido a una menor actividad de despolimerización. A altas velocidades (700 y 900 rpm), la transcripción aumenta en las primeras fases, pero disminuye en fase preestacionaria y estacionaria, lo que podría estar vinculado a la reducción del peso molecular del alginato. A estas velocidades, el oxígeno disuelto favorece la acción de las liasas y la despolimerización, disminuyendo el PMP del alginato. A velocidades más bajas (100 y 300 rpm), la transcripción de *alg8* aumenta en fases posteriores, favoreciendo la producción de alginato de mayor peso molecular, probablemente debido a una menor actividad de despolimerización.

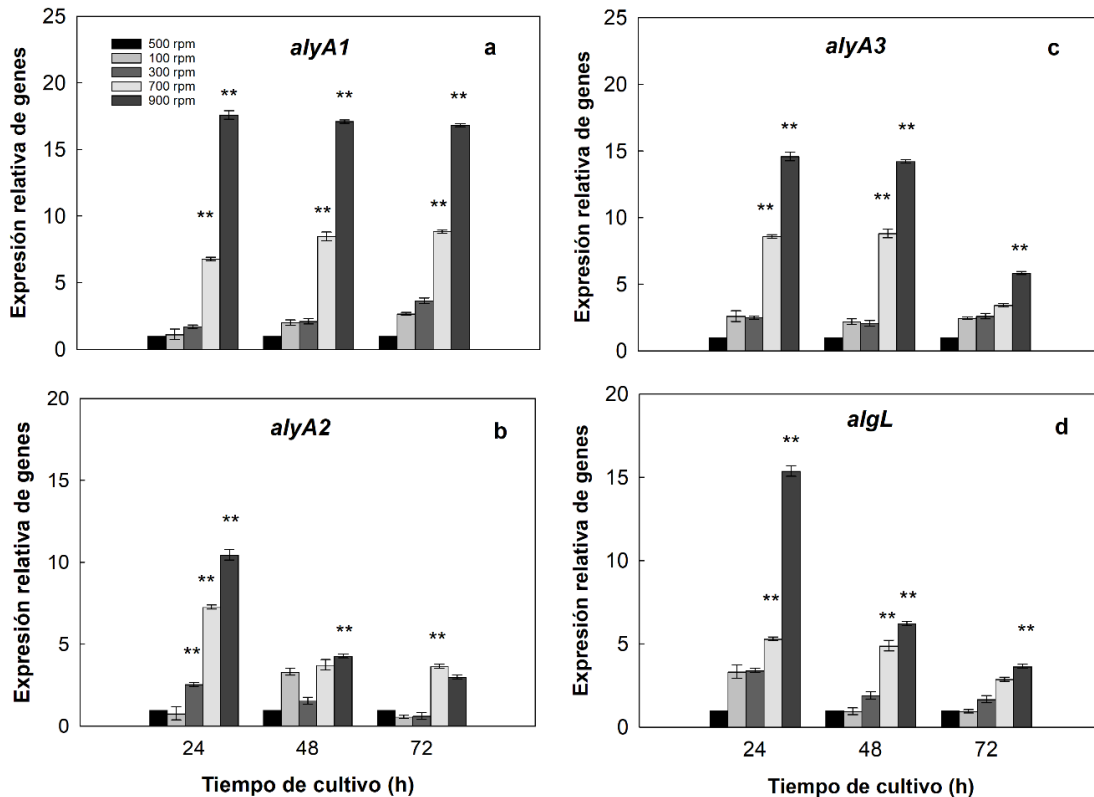
Los niveles de transcripción del gen *alg44* muestran un incremento a bajas velocidades de agitación, especialmente durante las fases pre-estacionaria y estacionaria, lo cual se asocia con una mayor producción de alginato de alto peso molecular. Esto se refleja en los cultivos a 100 rpm, donde se obtuvo un PMP<sub>máx</sub> de  $442 \pm 23$  kDa. Este patrón de transcripción podría reflejar una mayor activación del complejo biosintético responsable de la polimerización y exportación del alginato, favoreciendo la síntesis de cadenas de alto peso molecular en condiciones de baja agitación. En contraste, a velocidades de agitación elevadas (700 y 900 rpm), donde se observa una menor transcripción de *alg44*, es probable que aumente la actividad de alginasas, promoviendo la degradación parcial del polímero. Esto se traduce en una disminución del PMP del alginato producido bajo estas condiciones. Estos resultados refuerzan la hipótesis de que la regulación transcripcional de *alg44*, en conjunto con el entorno hidrodinámico, desempeña un papel clave en la determinación de la longitud y calidad de las cadenas de alginato sintetizadas por *A. vinelandii*.

Los niveles de transcripción del gen *alg44* muestran un aumento en su expresión a bajas velocidades de agitación en las fases pre-estacionarias y estacionarias, lo que se asocia con una mayor producción de alginato de alto peso molecular, como se observa en los cultivos a 100 rpm (PMP<sub>máx</sub> de  $442 \pm 23$  kDa). Este patrón de transcripción podría indicar la polimerización del alginato en condiciones de baja agitación, favoreciendo la producción de alginato con cadenas más largas. En contraste, a velocidades de agitación más altas (700 y 900 rpm), donde la transcripción de *alg44* es más baja, la mayor actividad de las liasas podría estar favoreciendo la degradación del alginato, lo que se refleja en una disminución del PMP del alginato.

Se llevó a cabo un análisis entre el (PMP del alginato y la expresión relativa de los genes *alg8* y *alg44* en los distintos tiempos de muestreo (24, 48 y 72 horas). Los resultados no muestran una correlación directa entre el aumento en la expresión relativa de los genes *alg8* y *alg44* y el peso molecular promedio del alginato. Por el contrario, los valores más altos de expresión génica se asociaron en varios casos con pesos moleculares más bajos. Esto sugiere que la transcripción de estos genes, aunque necesaria, no determina por sí sola la longitud del polímero, y que otros factores como la regulación post-transcripcional, las condiciones hidrodinámicas y la interacción con otras proteínas del sistema de biosíntesis también influyen de forma significativa.

### 8.3.5. Genes involucrados en la despolimerización del alginato: *alyA1*, *alyA2*, *alyA3* y *algL*

La Figura 8.15 muestra el análisis de 4 genes que codifica enzimas que poseen actividad de alginato liasa a diferentes tiempos de cultivo y velocidades de agitación.



**Figura 8.15** Perfiles de expresión relativa de genes involucrados en la despolimerización del alginato (*alyA1* (a), *alyA2* (b), *alyA3* (c) y *algL* (d)), a diferentes tiempos de cultivos (24, 48 y 72 h) en cultivos por lotes de *A. vinelandii* a diferentes velocidades de agitación.

El nivel de los transcritos de *alyA1*, *alyA2*, *alyA3* y *algL* se normalizó de acuerdo con el nivel del ARNm de *gyrA* como se describe en la Sección Materiales y métodos. Los datos se presentan como cambios en el pliegue con respecto al valor del calibrador (condición de 500 rpm). Los valores corresponden a promedios de tres réplicas independientes  $\pm$  desviación estándar. Las diferencias entre condiciones fueron evaluadas mediante análisis de varianza unidireccional (ANOVA). Se consideraron estadísticamente significativas según el siguiente criterio: \*  $P < 0,05$  (significativo), \*\*  $P < 0,01$  (muy significativo), \*\*\*  $P < 0,001$  (altamente significativo).

En la Figura 8.15a se muestra que, a las 24 h de cultivo, la transcripción aumentó aproximadamente el doble a 100 y 300 rpm en comparación con el control (500 rpm). A

velocidades de agitación más altas (700 y 900 rpm), este incremento fue aún mayor, alcanzando entre 6 y 17 veces los valores del control. Durante las fases pre-estacionaria (48 h) y estacionaria (72 h), los niveles de *alyA1* aumentaron entre 2 y 3 veces a 100 y 300 rpm. En contraste, a 700 y 900 rpm, la transcripción se mantuvo elevada, con incrementos de 9 y 17 veces, respectivamente, en comparación con el control.

En la Figura 8.15b se muestra que, durante la fase de crecimiento, la transcripción de *alyA2* a 100 rpm fue similar al control, pero a 300 rpm se duplicó. A 700 rpm, la transcripción aumentó 7 veces en comparación con 500 rpm, y a 900 rpm, aumentó 10 veces. Durante la fase preestacionaria (48 h), la expresión relativa de *alyA2* aumentó a 100 rpm, pero entre 300 y 900 rpm disminuyó cerca del 60% respecto a las 24 h de cultivo. Finalmente, a las 72 h de cultivo, los niveles de *alyA2* fueron similares a 700 y 900 rpm.

Respecto a *alyA3*, en la Figura 8.15c se muestra que, durante la fase de crecimiento la transcripción de *alyA3* aumentó aproximadamente 2,5 veces a 100 y 300 rpm. A 700 rpm, la transcripción aumentó 9 veces en comparación con 500 rpm, y a 900 rpm, aumentó 15 veces. Durante la fase preestacionaria (48 h), la expresión relativa de *alyA3* fue similar a 100 y 300 rpm, mientras que a 700 y 900 rpm se mantuvo constante. Finalmente, a las 72 h de cultivo, los niveles de *alyA3* disminuyeron cerca de un 60% a 700 y 900 rpm.

Finalmente, en la Figura 8.15d se muestra el perfil transcriptómico de *algL*. A las 24 h, se observó un aumento de *algL*, alcanzando niveles de 3 veces respecto al control a 100 y 300 rpm, 5 veces a 700 rpm y 15 veces a 900 rpm. Sin embargo, a las 48 h y 72 h de cultivo, los niveles de transcripción disminuyeron en aproximadamente un 60 % en todas las condiciones.

Respecto de estos resultados, Ponce et al., (2021) estudió que en cultivo por lotes a una VTO controlada en cultivos por lotes de *A. vinelandii* hubo un incremento de la transcripción de la alginato liasa (*alyA1*) (5,8 a 12 veces), una mayor transcripción del gen *alyA1* explica la disminución del peso molecular. En relación a *alyA2* y *alyA3*, existe poca información. Flores et al., (2013) hallaron que la transcripción de *alyA2* en *A. vinelandii* ATCC 9046 fue mayor bajo limitación de oxígeno (1% TOD vs. 5% TOD) en fases de crecimiento (4,9 veces) y estacionaria (2,3 veces). Esto sugiere que la limitación de oxígeno afecta la transcripción de *alyA2*, correlacionándose la disminución en fase estacionaria con nuestros hallazgos. En cuanto a *alyA3*, ellos observaron que la expresión de *alyA3* en cultivos con 1% de TOD fue significativamente mayor (2,0 y 1,6 veces en fase de crecimiento y estacionaria, respectivamente) en comparación con 5% de TOD. Esto indica que la actividad de la enzima

alginato liasa *alyA3* se ve estimulada por la limitación de oxígeno, promoviendo la despolimerización del alginato en estas fases de cultivo.

Cabe destacar, que existen varios reportes acerca del estudio de los niveles de transcripción de *algL* en diferentes modalidades de cultivo. Díaz-Barrera et al., (2011), en cultivos continuos bajo limitación de oxígeno, observaron un aumento de ~8 veces en la expresión de *algL* al incrementar la  $qO_2$  (de 2,2 a 4,8 mmol g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>). Esto sugiere que una mayor actividad de *algL* podría influir en la disminución del peso molecular del alginato. En un estudio posterior, Díaz-Barrera et al., (2017) analizaron la expresión de *algL* en cultivos continuos bajo diferentes TOD. Reportaron que a 1% TOD, la expresión de *algL* fue muy baja mientras que alcanzó sus niveles más altos con 8% TOD. Aunque la regulación de *algL* está claramente influenciada por TOD, su expresión no impactó significativamente el PMP del alginato, ya que este se mantuvo constante. Esto indica la participación de mecanismos de regulación post-transcripcionales o de otras alginato liasas. Finalmente, Flores et al., (2013) y Díaz-Barrera et al., (2012) concluyeron que el nivel de expresión de *algL* no es el único factor determinante del PMP del alginato. Flores et al., (2013) demostraron que a una mayor expresión de *algL* al 1% TOD, se obtenían alginatos de alto PMP (1200 kDa). De manera similar, Díaz-Barrera et al., (2012) no encontraron correlación directa entre la expresión de *algL* y el peso molecular obtenido en cultivo continuo sin control del oxígeno disuelto, sugiriendo la implicación de otras liasas en esta regulación durante el estado estacionario.

Este estudio es el primero en analizar la transcripción de las enzimas alginato liasas *alyA1*, *alyA2*, *alyA3* y *algL* bajo diferentes condiciones de velocidad de agitación. Los resultados indican que el oxígeno disuelto regula significativamente la expresión de estas enzimas, favoreciendo su transcripción en las fases de crecimiento y preestacionaria, especialmente a velocidades de agitación más altas. Esto sugiere una estrecha relación entre el oxígeno disuelto y la degradación del alginato en *A. vinelandii*.

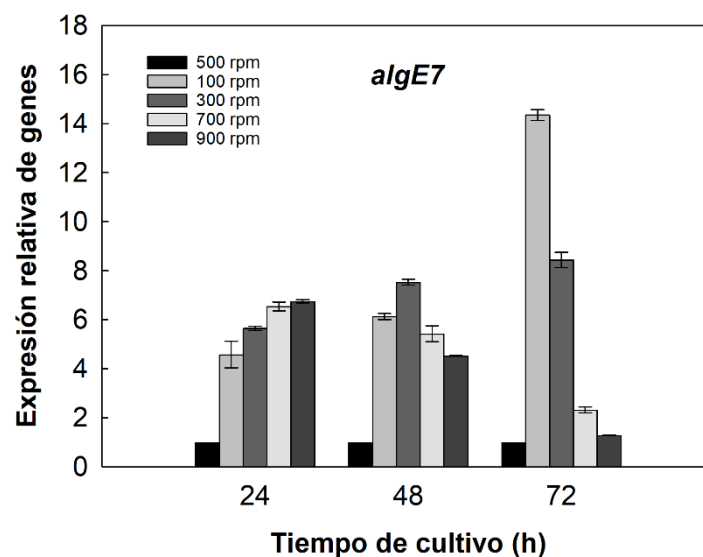
Además, se observó una relación directa entre las liasas de alginato y PMP del alginato, donde existe una interacción compleja que depende tanto de las condiciones de agitación como de la expresión de las enzimas responsables de la despolimerización. A velocidades de agitación bajas (100 y 300 rpm), el PMP alcanzó valores máximos de 308 ± 12 kDa y 442 ± 23 kDa, respectivamente, en las primeras fases del cultivo. En estas condiciones, no se observó una mayor expresión transcripcional de las alginato liasas, lo que indica que la síntesis de alginato podría estar favorecida. En contraste a estos resultados, a medida que se incrementó la agitación a 500 rpm, se observó un aumento en el PMP durante la fase de crecimiento (8 - 32 h), seguido de una disminución hacia la fase estacionaria. Este

patrón coincide con la actividad de las enzimas alginato liasas, como *alyA1*, *alyA2*, *alyA3* y *algL*, que son responsables de la degradación del alginato en la fase estacionaria, lo que podría explicar la reducción del PMP del alginato.

Por otro lado, a altas velocidades de agitación (700 y 900 rpm), el PMP del alginato fue más bajo desde el inicio y disminuyó aún más en la fase estacionaria. Esto sugiere que una mayor transferencia de oxígeno regula la expresión de las liasas, promoviendo la despolimerización del alginato. Estos resultados indican que tanto la expresión de las liasas de alginato como la velocidad de agitación son factores clave que influyen en el PMP del alginato. Esto proporciona una vía para controlar sus propiedades mediante la modulación de la actividad enzimática y las condiciones de cultivo. Si bien este estudio ha demostrado que tanto la actividad de la alginasa intracelular como la extracelular están presentes a lo largo del cultivo, pero en diferentes fases del crecimiento. Por lo tanto, el peso molecular del alginato puede ser el resultado del balance entre la acción del complejo de la polimerasa y la actividad de la alginasa en el cultivo de *A. vinelandii*.

### 8.3.6. Genes involucrados en la epimerización del alginato

En la Figura 8.16 se muestran los niveles de transcripción de *algE7* evaluadas a diferentes tiempos de cultivos y velocidades de agitación.



**Figura 8.16** Perfil de expresión relativa de genes involucrados en la epimerización del alginato (*algE7*), a diferentes tiempos de cultivos (24, 48 y 72 h) en cultivos por lotes de *A. vinelandii* a diferentes velocidades de agitación.

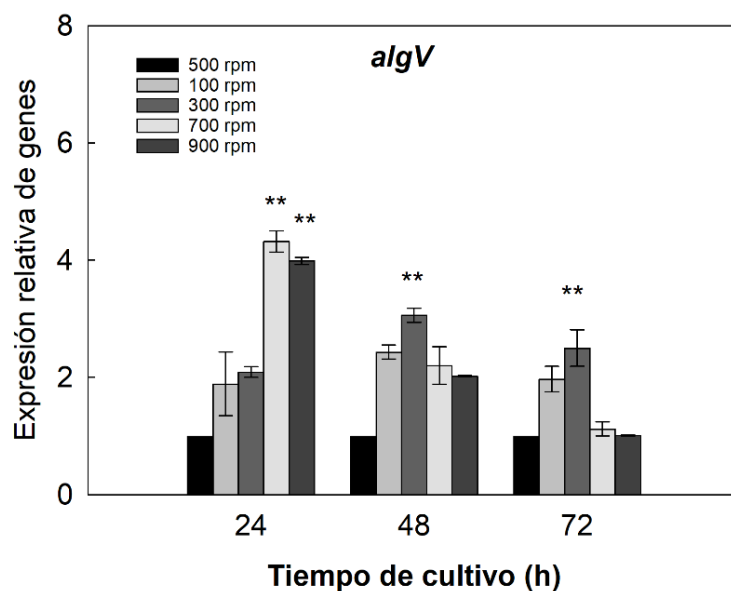
El nivel de los transcritos de *algE7* se normalizó de acuerdo con el nivel del ARNm de *gyrA* como se describe en la Sección Materiales y métodos. Los datos se presentan como cambios en el pliegue con respecto al valor del calibrador (condición de 500 rpm). Los valores corresponden a promedios de tres réplicas independientes  $\pm$  desviación estándar. Las diferencias entre condiciones fueron evaluadas mediante análisis de varianza unidireccional (ANOVA). Se consideraron estadísticamente significativas según el siguiente criterio: \*  $P < 0,05$  (significativo), \*\*  $P < 0,01$  (muy significativo), \*\*\*  $P < 0,001$  (altamente significativo).

La Figura 8.16 muestra la expresión relativa del gen *algE7* en función de las velocidades de agitación y los tiempos de cultivo. A las 24 horas, se detectó un aumento en los niveles de transcripción de *algE7* a 700 y 900 rpm. En la fase pre-estacionaria, se observó un aumento en los niveles de expresión relativa a bajas velocidades de agitación, alcanzando aproximadamente cinco veces más que el control. No obstante, a altas velocidades de agitación la expresión relativa fue entre 9 y 14 veces respectivamente, a las 72 h de cultivo a 700 y 900 rpm, la expresión relativa del gen *algE7* disminuyó considerablemente.

Por otra parte, Ponce et al., (2021), describió previamente, que en cultivos por lotes de *A. vinelandii*, la expresión del gen *algE7* fue menor respecto del control. En cambio, en la fase preestacionaria (48 h) se obtuvo que la expresión relativa de *algE7* fue 1,6 veces mayor respecto del control. Una posibilidad es que los cambios en los niveles de transcripción de *algE7* estén relacionados con variaciones en el contenido de gúlicodel alginato. A 100 y 300 rpm, la relación G/M presentó variaciones mínimas, con una ligera disminución al final del cultivo, posiblemente influenciada por la actividad liasa. En contraste, a 700 y 900 rpm, la relación G/M se mantuvo constante, lo que sugiere una actividad más estable de *algE7* en estas condiciones por lo que se podría sugerir que la expresión de *algE7* podría tener una actividad de depolimerización de alginato. Estos resultados subrayan la influencia de la expresión de *algE7* en la composición monomérica del alginato, donde las variaciones en la proporción G/M reflejan los cambios en la actividad de las enzimas codificadas por este gen, tal como lo describe Gaardlås et al., (2022), quienes enfatizan que ambas actividades se influyen mutuamente al cambiar constantemente las cadenas de alginato, y la formación del producto depende en gran medida del sustrato sobre el que actúa la enzima

### 8.3.7. Genes involucrados en la acetilación del alginato

La Figura 8.17 muestra la expresión del gen *algV* que codifica la enzima AlgV evaluada a diferentes tiempos de cultivo y velocidades de agitación.



**Figura 8.17** Perfil de expresión relativa de genes involucrados en la acetilación del alginato (*algV*) diferentes tiempos de cultivos (24, 48 y 72 h) en cultivos por lotes de *A. vinelandii* a diferentes velocidades de agitación.

El nivel de los transcritos de *algV* se normalizó de acuerdo con el nivel del ARNm de *gyrA* como se describe en la Sección Materiales y métodos. Los datos se presentan como cambios en el pliegue con respecto al valor del calibrador (condición de 500 rpm). Los valores corresponden a promedios de tres réplicas independientes  $\pm$  desviación estándar. Las diferencias entre condiciones fueron evaluadas mediante análisis de varianza unidireccional (ANOVA). Se consideraron estadísticamente significativas según el siguiente criterio: \*  $P < 0,05$  (significativo), \*\*  $P < 0,01$  (muy significativo), \*\*\*  $P < 0,001$  (altamente significativo).

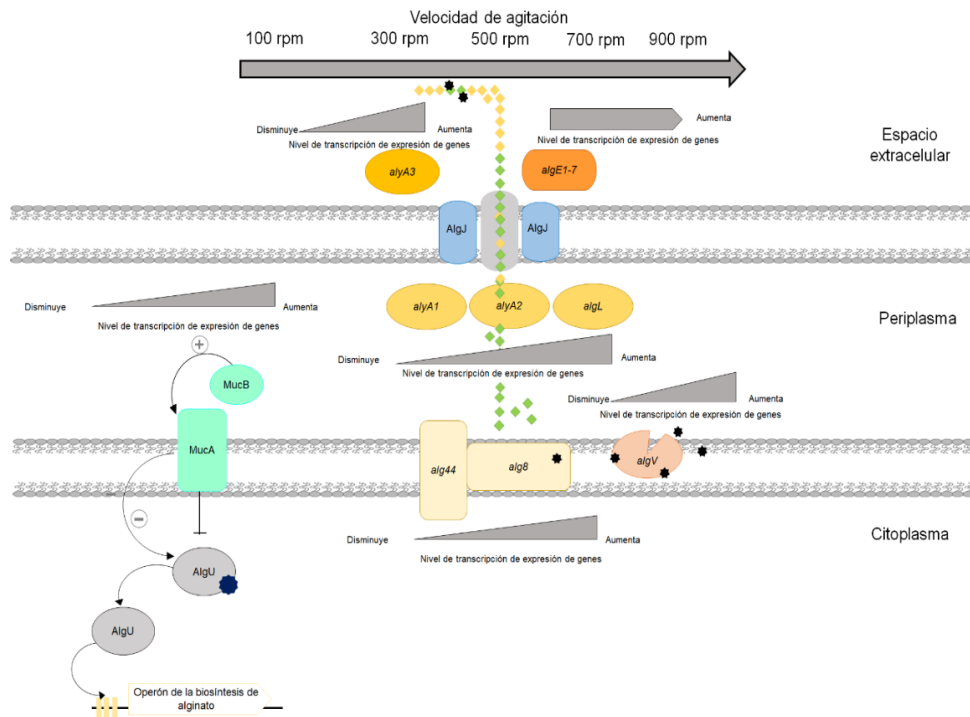
La Figura 8.17 muestra la expresión relativa del gen *algV*, a las 24 horas, se detectó un aumento en los niveles de transcripción de *algV* en todas las velocidades de agitación. A 100 y 300 rpm, los niveles de transcripción fueron similares, aproximadamente dos veces mayores que el control. Sin embargo, al aumentar la velocidad de agitación, la expresión fue de cuatro veces más que el control. En la fase preestacionaria, se observó un aumento en los niveles de expresión relativa a bajas velocidades de agitación, alcanzando aproximadamente tres veces más que el control. Finalmente, en la fase estacionaria, se hubo un aumento

significativo a bajas velocidades de agitación respecto del control. En un estudio realizado en cultivo continuo a diferentes D, Díaz-Barrera et al., (2017) investigaron la expresión de los genes *algV* y *algI*, responsables de la O-acetilación, en estado estacionario. Sus resultados mostraron que se obtiene un mayor porcentaje de acetilación independientemente de la D y ellos sugieren que existe un cambio metabólico en los flujos del acetil-CoA donde una alta TOD podría mejorar la acetilación del alginato. Castillo et al., (2013) investigaron, en cultivo continuo con glucosa limitada, cómo la TOD y  $\mu$  afectan la acetilación del alginato. Al variar el TOD (1% y 9%) y la  $\mu$  (0,02 - 0,15 h<sup>-1</sup>), encontraron que a un TOD del 9% se incrementó la acetilación, alcanzando un valor de 6,88%. Además, observaron que a una TOD alta y a un  $\mu$  bajo, la respiración celular disminuía y la acumulación de PHB era mínima, lo que sugiere que el acetil-CoA se desviaba hacia la acetilación del alginato.

Cabe destacar que es el primer estudio que evalúa la expresión del gen *algV* a diferentes velocidades de agitación en cultivos por lotes de *A. vinelandii* ATCC 9046, esta expresión puede ser correlacionada con el grado de acetilación del alginato producido. Se observó que a velocidades de agitación bajas, se registró una disminución tanto en la expresión de *algV* como en el grado de acetilación. En cambio a velocidades de agitación más altas los valores más altos del grado de acetilación se produjeron en la fase de crecimiento lo cual se correlaciona con la expresión del gen

Estos resultados sugieren que la velocidad de agitación influye directamente en la O-acetilación del alginato, posiblemente a través de la regulación de la expresión del gen *algV*. Por lo tanto, el control preciso de la velocidad de agitación emerge como un factor crítico para optimizar la producción de alginato con propiedades deseadas, destacando la interdependencia entre las condiciones de cultivo, la expresión génica y la calidad del producto final.

Posterior al análisis de la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de alginato, respiración, fijación de nitrógeno y estrés celular, la Figura 8.18 muestra una representación esquemática integral de las respuestas de la expresión génica asociadas a la biosíntesis de alginato en cultivos por lotes de *A. vinelandii* a las 24 horas, bajo diferentes velocidades de agitación. Este esquema es crucial para comprender cómo las condiciones de cultivo, particularmente la disponibilidad de oxígeno modulada por la velocidad de agitación, pueden influir en la producción y características del alginato.



**Figura 8.18** Representación esquemática de respuestas moleculares moduladas por la velocidad de agitación en fase de crecimiento (24 horas) en cultivos por lotes de *A. vinelandii*.

La Figura 8.18 muestra que el aumento de la velocidad de agitación (de 100 a 900 rpm) modula la expresión de diversos genes en distintos compartimentos celulares (citoplasma, periplasma y espacio extracelular). En este contexto, el análisis de la expresión del gen *alg44* reviste especial importancia debido a la función esencial de su producto proteico, Alg44, en la polimerización del alginato (Flores et al., 2013). Se ha propuesto que este complejo de polimerización interviene directamente en la formación de la cadena polimérica del alginato, lo que otorga mayor relevancia a la expresión de *alg44* (Moradali & Rehm, 2020). Además, se sabe que su actividad está regulada por MucR, una proteína que contiene un dominio de diguanilato ciclasa, fundamental para la síntesis de c-di-GMP, un factor indispensable en la biosíntesis del alginato (Hay et al., 2009; Moradali et al., 2017).

Ahumada-Manuel et al. (2017) determinaron que existe un módulo de control de c-di-GMP en *A. vinelandii*, compuesto por la diguanilato ciclasa AvGReg y la fosfodiesterasa MucG, el cual regula tanto la cantidad como el peso molecular del alginato producido. En este sentido, se puede postular que el gen *alg44*, que codifica la enzima Alg44, es clave en la polimerización del alginato y actúa como receptor dentro de este mecanismo de regulación. Su expresión, sin embargo, depende de ciertas condiciones: por ejemplo, la figura 9.10 muestra que, a las 24 h de cultivo, la expresión de *alg44* fue similar a la del control cuando había limitación de oxígeno en cada velocidad de agitación. Este hallazgo respalda lo

planteado por Flores et al., (2015), quienes, basándose en reportes previos, propusieron que la síntesis de c-di-GMP se ve favorecida a bajas concentraciones de oxígeno, lo cual estimula la actividad del complejo polimerizador Alg8-Alg44.

Ahumada-Manuel et al., (2020) demostraron que el segundo mensajero c-di-GMP regula tanto la producción como el peso molecular del alginato en *A. vinelandii*. Reportaron que, a una VTO más baja, se acumulan mayores niveles de c-di-GMP. Este hallazgo sugiere firmemente que el mecanismo molecular involucrado en la producción de alginato y su peso molecular depende de un módulo de señalización basado en c-di-GMP. Esta afirmación se corrobora con los resultados observados a bajas velocidades de agitación, donde, después de 48 h de cultivo, los niveles de expresión de los genes *alg8* y *alg44* se incrementaron en comparación con el control. Esto podría ser un indicador de la interacción de MucG directamente con Alg44 y su impacto es la activación de la polimerasa Alg8-Alg44.

Por otra parte, se observa una tendencia al aumento en la expresión de las liasas de alginato (como *alyA1*, *alyA2*, *alyA3*, *algE1-7* y *algL*) a medida que incrementa la velocidad de agitación, lo que podría estar relacionado con una mayor actividad enzimática orientada a la modificación del polímero, más que a su degradación completa. En este contexto, (Flores et al., (2013) demostraron que el control de la TOD entre 1 y 5 % influye directamente en la expresión de los genes que codifican estas enzimas en *A. vinelandii*. A una TOD de 1 %, se observó una mayor expresión de liasas intracelulares, asociada a la producción de alginatos de mayor peso molecular; en cambio, a 5 % TOD predominó la actividad de liasas extracelulares, resultando alginatos de PMP más bajos. Estos hallazgos se relacionan con lo observado en las condiciones de agitación evaluadas, donde el aumento de la velocidad de agitación promovió una mayor producción total de alginato, pero con un peso molecular menor. Esto sugiere que el oxígeno disuelto, al aumentar con la agitación, podría inducir la expresión de liasas que acortan la longitud del polímero, sin afectar negativamente la cantidad total producida.

Además, la presencia de  $\text{CaCl}_2$  en el medio podría influir en esta dinámica, ya que el ion  $\text{Ca}^{+2}$  interactúa con los bloques de ácido gulurónico (G) del alginato, estabilizando su estructura mediante enlaces tipo “egg-box”. Esta estabilización puede modificar la accesibilidad del polímero a las liasas, dependiendo de su concentración y del tipo de enzima expresada (Xue et al., 2022). Asimismo, el  $\text{CaCl}_2$  puede alterar la viscosidad del medio y la transferencia de oxígeno, afectando indirectamente la expresión y actividad de las enzimas alginato liasas. En conjunto, estos factores podrían explicar por qué a mayor velocidad de agitación se obtiene más alginato, pero de menor tamaño molecular.

Respecto de la expresión de *algE7* que codifica una enzima epimerasa AlgE7, se observa un aumento consistente a las 24 horas en todas las condiciones de agitación evaluadas, lo que indica un rol clave de esta epimerasa-liasa en las primeras etapas de modificación del alginato. La enzima AlgE7 cataliza tanto la epimerización de residuos  $\beta$ -D-manurónicos (M) en  $\alpha$ -L-gulurónicos (G), como la ruptura del polímero mediante una reacción de  $\beta$ -eliminación. Gaardl s et al., (2022), determinaron que esta dualidad funcional se debe a un mecanismo compartido, cuya acción depende de la orientación del sustrato y la modulación del entorno catalítico por iones como  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Na}^{+}$ . Experimentalmente, se observa que a las 24 h también comienza a aumentar la relación G/M, especialmente a velocidades de agitación, lo que indica una activa incorporación de residuos G, esenciales para la gelificación del alginato. Así, la expresión de *algE7* parece estar estrechamente relacionada más que con la velocidad de agitación con el entorno en el cual la enzima se encuentra.

La compleja regulación biosintética del alginato en *A. vinelandii* se evidencia en la modulación de genes clave como *algU* y su interacción con MucA/MucB. Los resultados experimentales a las 24 horas de cultivo mostraron diferencias en el peso molecular y la producción de alginato según la velocidad de agitación. En este contexto, se podría sugerir que la expresión de *algU* podría estar más directamente vinculada a la cantidad total de alginato producido que a su peso molecular (tamaño de la cadena). Esta interpretación se ve reforzada por la observación de una mayor expresión de *algU* a altas velocidades de agitación entre las 48 y 72 horas de cultivo, un período que coincide con una elevada producción de alginato en esas condiciones.

Esta correlación entre la mayor expresión de *algU* y la cantidad de alginato producido se podría relacionar con *P. aeruginosa*. Yin et al., (2013) demostraron que la activación de AlgU en *P. aeruginosa*, ya sea por sobreexpresión o por la modulación de otros factores sigma como RpoD, conduce directamente a un aumento en la producción de alginato. Este paralelismo sugiere que, a pesar de las diferencias entre especies, AlgU actúa como un regulador clave de la cantidad total de alginato. Sin embargo, la distinción observada en nuestro estudio, donde *algU* parece influir más en la producción que en el peso molecular del polímero, deja abierta a interrogantes sobre la complejidad de su regulación en *A. vinelandii*. Esto abre una vía futura para investigar más a fondo la expresión *algU* y su regulación postraduccional, así como su interacción con otras proteínas de la vía de biosíntesis del alginato, bajo diversas condiciones de cultivo, para aclarar cómo estas interacciones modulan tanto la cantidad como la calidad del alginato producido por *A. vinelandii*.

## 9. CONCLUSIÓN

El presente trabajo permitió comprender de manera profunda cómo las condiciones hidrodinámicas, moduladas por la velocidad de agitación, afectan de forma directa e indirecta el comportamiento fisiológico y molecular de *A. vinelandii*, en relación con su respiración celular, producción y calidad del alginato, así como la expresión génica relacionada con su biosíntesis y adaptación al entorno.

Se estableció una correlación entre la VCO con la velocidad de agitación. Se observó que la VCO aumentó de forma progresiva entre 50 y 200 rpm, alcanzando una meseta entre 200 y 500 rpm ( $\sim 1,2 - 1,3 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ). Sin embargo, por encima de 600 rpm, la VCO disminuye, indicado un posible efecto hidrodinámico. Además, se estableció que la  $qO_2$ , es un parámetro fisiológico sensible al entorno hidrodinámico en cultivos de *A. vinelandii*, y que se encuentra estrechamente vinculada con la producción y calidad del alginato. Estos datos permitieron establecer un rango óptimo de agitación, entre 200 y 500 rpm, donde las células mantienen una respiración eficiente sin signos de daño fisiológico evidente, confirmando que la  $qO_2$  puede ser utilizada como un indicador del estado hidrodinámico del cultivo.

Para explorar con mayor profundidad el efecto de la velocidad de agitación, se amplió el rango hasta 900 rpm. Se determinó que, entre 100 y 500 rpm, la  $qO_2$  y el PMP el alginato aumentaron, alcanzando máximos de  $69 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  y 660 kDa. A mayores velocidades, ambos disminuyeron, lo que indica que la agitación influye directamente en la calidad del alginato. Este efecto podría deberse al estrés hidrodinámico, y se plantea que la velocidad de agitación podría regular genes clave en la biosíntesis del polímero. Este hallazgo resalta que, más allá de la cantidad, la calidad del alginato se ve severamente afectada por la hidrodinámica del sistema. Además, se determinó que el poder viscosificante del alginato disminuye a medida que la  $VTO_{\text{máx}}$  aumenta por encima de  $15 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , probablemente debido a una mayor fragmentación del polímero por efecto mecánico. Este hallazgo resalta que, más allá de la cantidad, la calidad del alginato se ve severamente afectada por la hidrodinámica del sistema. Finalmente se determinó que la morfología celular de *A. vinelandii* varía drásticamente según la velocidad de agitación la cual se encuentra asociada a la hidrodinámica del sistema, y contribuye también a modular la calidad del biopolímero.

Finalmente, a nivel transcripcional, se observó una mayor expresión del gen regulador global *algU* a 700 - 900 rpm (5 - 8 veces), correlacionando con la alta producción de alginato bajo estas condiciones. Del mismo modo, *rpoS* se sobreexpresó progresivamente en fases avanzadas del cultivo, reflejando una respuesta al estrés celular inducido por el entorno hidrodinámico.

Se demuestra que la respiración celular es un eje central en la fisiología de *A. vinelandii* y que la  $qO_2$ , además de reflejar el estado metabólico, actúa como un indicador efectivo del impacto del cizallamiento sobre la calidad del biopolímero. El control preciso de la velocidad de agitación permite definir condiciones óptimas (especialmente alrededor de 500 rpm) para maximizar tanto la producción como la calidad estructural del alginato, lo cual tiene implicaciones directas en el diseño de bioprocesos robustos y escalables. Este enfoque integral, que combina fisiología, morfología, propiedades fisicoquímicas y expresión génica, constituye una herramienta poderosa para la optimización racional de procesos industriales de biosíntesis de alginato con propiedades funcionales específicas

## 10. RECOMENDACIONES Y PROYECCIONES

Este estudio abre diversas líneas de investigación que podrían complementar los resultados obtenidos sobre la producción de alginato por *A. vinelandii* ATCC 9046. A continuación, se proponen algunas recomendaciones y proyecciones:

- a) Desarrollo de un modelo metabólico matemático: Actualmente se está iniciando la construcción de un modelo matemático del metabolismo central de *A. vinelandii*, enfocado en la respiración el cual no ha sido reportado hasta la fecha. Esta herramienta permitirá integrar datos experimentales y de expresión de genes para predecir la distribución de flujos metabólicos, optimizar condiciones de cultivo y eventualmente guiar estrategias de ingeniería metabólica para aumentar la producción y calidad del alginato.
- b) Análisis transcriptómico (RNA-Seq): Para entender en mayor profundidad los genes involucrados en la respuesta celular a distintos niveles de agitación, ya se está llevando a cabo un análisis de expresión génica mediante RNA-Seq. Este enfoque permitirá identificar rutas metabólicas clave activadas bajo diferentes condiciones de respiración y efecto hidrodinámico.
- c) Estudios postraduccionales de proteínas: Complementando la expresión génica, se propone realizar estudios postraduccionales para caracterizar modificaciones enzimáticas que puedan estar regulando la producción del alginato, en especial aquellas relacionadas con la actividad de las alginato liasas y oxidasas respiratorias.
- d) Caracterización mecánica del hidrogel: Derivado de este estudio, se adjudicó un proyecto VIU financiado por ANID enfocado en el desarrollo de un prototipo de hidrogel a base de alginato bacteriano. Se recomienda complementar la caracterización fisicoquímica del biopolímero con ensayos de propiedades mecánicas (elasticidad, resistencia, porosidad), clave para validar su aplicabilidad como material para uso dental.
- e) Utilización de la  $qO_2$  como parámetro para escalar: Dado que la  $qO_2$  mostró ser un indicador importante en la hidrodinámica y en la producción de alginato, se recomienda evaluar su uso como parámetro de referencia para el escalamiento de biorreactores.

## 11. REFERENCIAS

- Aarstad, O. A., Stanisci, A., Sætrom, G. I., Tøndervik, A., Sletta, H., Aachmann, F. L., & Skjåk-Bræk, G. (2019). Biosynthesis and Function of Long Guluronic Acid-Blocks in Alginate Produced by *Azotobacter vinelandii*. *Biomacromolecules*, 20(4), 1613-1622. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.8b01796>
- Aarstad, O., Heggset, E. B., Pedersen, I. S., Bjørnøy, S. H., Syverud, K., & Strand, B. L. (2017). Mechanical Properties of Composite Hydrogels of Alginate and Cellulose Nanofibrils. *Polymers*, 9(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/polym9080378>
- Acedos, M. G., Hermida, A., Gomez, E., Santos, V. E., & Garcia-Ochoa, F. (2019). Effects of fluid-dynamic conditions in *Shimwellia blattae* (p424IbPSO) cultures in stirred tank bioreactors: Hydrodynamic stress and change of metabolic routes by oxygen availability. *Biochemical Engineering Journal*, 149, 107238. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.107238>
- Adaya, L., Millán, M., Peña, C., Jendrossek, D., Espín, G., Tinoco-Valencia, R., Guzmán, J., Pfeiffer, D., & Segura, D. (2018). Inactivation of an intracellular poly-3-hydroxybutyrate depolymerase of *Azotobacter vinelandii* allows to obtain a polymer of uniform high molecular mass. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(6), 2693-2707. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8806-y>
- Agarwal, T., Kabiraj, P., Narayana, G. H., Kulanthaivel, S., Kasiviswanathan, U., Pal, K., Giri, S., Maiti, T. K., & Banerjee, I. (2016). Alginate Bead Based Hexagonal Close Packed 3D Implant for Bone Tissue Engineering. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 8(47), 32132-32145. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b08512>
- Ahmad Raus, R., Wan Nawawi, W. M. F., & Nasaruddin, R. R. (2021). Alginate and alginate composites for biomedical applications. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 16(3), 280-306. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2020.10.001>
- Ahumada-Manuel, C. L., Guzmán, J., Peña, C., Quiroz-Rocha, E., Espín, G., & Núñez, C. (2017). The signaling protein MucG negatively affects the production and the molecular mass of alginate in *Azotobacter vinelandii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(4), 1521-1534. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7931-8>
- Ahumada-Manuel, C. L., Martínez-Ortiz, I. C., Hsueh, B. Y., Guzmán, J., Waters, C. M., Zamorano-Sánchez, D., Espín, G., & Núñez, C. (2020). Increased c-di-GMP Levels Lead to the Production of Alginates of High Molecular Mass in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*, 202(24), 10.1128/jb.00134-20. <https://doi.org/10.1128/jb.00134-20>
- Albrecht, M. T., & Schiller, N. L. (2005). Alginate Lyase (AlgL) Activity Is Required for Alginate Biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 187(11), 3869-3872. <https://doi.org/10.1128/jb.187.11.3869-3872.2005>

- Anderlei, T., Zang, W., Papaspyrou, M., & Büchs, J. (2004). Online respiration activity measurement (OTR, CTR, RQ) in shake flasks. *Biochemical Engineering Journal*, 17(3), 187-194. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(03\)00181-5](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(03)00181-5)
- Andersen, T., Auk-Emblem, P., & Dornish, M. (2015). 3D Cell Culture in Alginate Hydrogels. *Microarrays*, 4(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/microarrays4020133>
- Anderson, A. J., & Dawes, E. A. (1990). Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiological Reviews*, 54(4), 450-472. <https://doi.org/10.1128/mr.54.4.450-472.1990>
- Andler, R., Rojas, V., Pino, V., Castro, R. I., Valdés, C., Kumar, V., Peña, C., & Díaz-Barrera, A. (2023). Efficient production of a polyhydroxyalkanoate by *Azotobacter vinelandii* OP using apple residues as promising feedstock. *International Journal of Biological Macromolecules*, 242, 124626. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124626>
- Aston, R., Sewell, K., Klein, T., Lawrie, G., & Grøndahl, L. (2016). Evaluation of the impact of freezing preparation techniques on the characterisation of alginate hydrogels by cryo-SEM. *European Polymer Journal*, 82, 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2016.06.025>
- Bakkevig, K., Sletta, H., Gimmestad, M., Aune, R., Ertesvåg, H., Degnes, K., Christensen, B. E., Ellingsen, T. E., & Valla, S. (2005). Role of the *Pseudomonas fluorescens* Alginate Lyase (AlgL) in Clearing the Periplasm of Alginates Not Exported to the Extracellular Environment. *Journal of Bacteriology*, 187(24), 8375-8384. <https://doi.org/10.1128/jb.187.24.8375-8384.2005>
- Bandaipheth, C., & Prasertsan, P. (2006). Effect of aeration and agitation rates and scale-up on oxygen transfer coefficient,  $k_La$  in exopolysaccharide production from *Enterobacter cloacae* WD7. *Carbohydrate Polymers*, 66(2), 216-228. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.03.004>
- Bandyopadhyay, B., Humphrey, A. E., & Taguchi, H. (1967). Dynamic measurement of the volumetric oxygen transfer coefficient in fermentation systems. *Biotechnology and Bioengineering*, 9(4), 533-544. <https://doi.org/10.1002/bit.260090408>
- Barba, A. A., Lamberti, G., Rabbia, L., Grassi, M., Larobina, D., & Grassi, G. (2014). Modeling of the reticulation kinetics of alginate/pluronic blends for biomedical applications. *Materials Science and Engineering: C*, 37, 327-331. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.01.034>
- Barbosa, M. J., Albrecht, M., & Wijffels, R. H. (2003). Hydrodynamic stress and lethal events in sparged microalgae cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 83(1), 112-120. <https://doi.org/10.1002/bit.10657>
- Barney, B. M. (2020). Aerobic nitrogen-fixing bacteria for hydrogen and ammonium production: Current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(4), 1383-1399. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10210-9>
- Baysal, K., Aroguz, A. Z., Adiguzel, Z., & Baysal, B. M. (2013). Chitosan/alginate crosslinked hydrogels: Preparation, characterization and application for cell growth purposes. *International*

Bellenger, J.-P., Wichard, T., Xu, Y., & Kraepiel, A. M. L. (2011). Essential metals for nitrogen fixation in a free-living N<sub>2</sub>-fixing bacterium: Chelation, homeostasis and high use efficiency. *Environmental Microbiology*, 13(6), 1395-1411. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02440.x>

Bertsova, Y. V., Bogachev, A. V., & Skulachev, V. P. (1998). Two NADH:ubiquinone oxidoreductases of *Azotobacter vinelandii* and their role in the respiratory protection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1363(2), 125-133. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(97\)00094-7](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(97)00094-7)

Bhattarai, N., & Zhang, M. (2007). Controlled synthesis and structural stability of alginate-based nanofibers. *Nanotechnology*, 18(45), 455601. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/18/45/455601>

Bhujbal, S. V., Paredes-Juarez, G. A., Niclou, S. P., & de Vos, P. (2014). Factors influencing the mechanical stability of alginate beads applicable for immunoisolation of mammalian cells. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 37, 196-208. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2014.05.020>

Bojorges, H., López-Rubio, A., Martínez-Abad, A., & Fabra, M. J. (2023). Overview of alginate extraction processes: Impact on alginate molecular structure and techno-functional properties. *Trends in Food Science & Technology*, 140, 104142. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.104142>

Bonartseva, G. A., Akulina, E. A., Myshkina, V. L., Voinova, V. V., Makhina, T. K., & Bonartsev, A. P. (2017). Alginate biosynthesis by *Azotobacter* bacteria. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 53(1), 52-59. <https://doi.org/10.1134/S0003683817010070>

Caccavo, D., Cascone, S., Lamberti, G., & Barba, A. A. (2015). Modeling the Drug Release from Hydrogel-Based Matrices. *Molecular Pharmaceutics*, 12(2), 474-483. <https://doi.org/10.1021/mp500563n>

Cano-Vicent, A., Tuñón-Molina, A., Bakshi, H., Sabater i Serra, R., Alfagih, I. M., Tambuwala, M. M., & Serrano-Aroca, Á. (2023). Biocompatible Alginate Film Crosslinked with Ca<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> Possesses Antibacterial, Antiviral, and Anticancer Activities. *ACS Omega*, 8(27), 24396-24405. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c01935>

Castillo, T., García, A., Padilla-Córdova, C., Díaz-Barrera, A., & Peña, C. (2020). Respiration in *Azotobacter vinelandii* and its relationship with the synthesis of biopolymers. *Electronic Journal of Biotechnology*, 48, 36-45. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2020.08.001>

Castillo, T., Heinzle, E., Peifer, S., Schneider, K., & Peña M, C. F. (2013). Oxygen supply strongly influences metabolic fluxes, the production of poly(3-hydroxybutyrate) and alginate, and the degree of acetylation of alginate in *Azotobacter vinelandii*. *Process Biochemistry*, 48(7), 995-1003. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.04.014>

- Castillo, T., López, I., Flores, C., Segura, D., García, A., Galindo, E., & Peña, C. (2018). Oxygen uptake rate in alginate producer (algU+) and nonproducer (algU-) strains of *Azotobacter vinelandii* under nitrogen-fixation conditions. *Journal of Applied Microbiology*, *125*(1), 181-189. <https://doi.org/10.1111/jam.13760>
- Cerri, M. O., Nordi Esperança, M., Colli Badino, A., & Perencin de Arruda Ribeiro, M. (2016). A new approach for kLa determination by gassing-out method in pneumatic bioreactors. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, *91*(12), 3061-3069. <https://doi.org/10.1002/jctb.4937>
- Chalmers, J. J. (2015). Mixing, aeration and cell damage, 30+ years later: What we learned, how it affected the cell culture industry and what we would like to know more about. *Current Opinion in Chemical Engineering*, *10*, 94-102. <https://doi.org/10.1016/j.coche.2015.09.005>
- Chalmers, J. J. (2021). The challenges of hydrodynamic forces on cells used in cell manufacturing and therapy. *Current Opinion in Biomedical Engineering*, *20*, 100357. <https://doi.org/10.1016/j.cobme.2021.100357>
- Chalmers, J. J., & Ma, N. (2015). Hydrodynamic Damage to Animal Cells. En M. Al-Rubeai (Ed.), *Animal Cell Culture* (pp. 169-183). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-10320-4\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-319-10320-4_6)
- Chen, J., Hu, Y., Zhang, L., Wang, Y., Wang, S., Zhang, Y., Guo, H., Ji, D., & Wang, Y. (2017). Alginate Oligosaccharide DP5 Exhibits Antitumor Effects in Osteosarcoma Patients following Surgery. *Frontiers in Pharmacology*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00623>
- Ching, S. H., Bansal, N., & Bhandari, B. (2017). Alginate gel particles—A review of production techniques and physical properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *57*(6), 1133-1152. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.965773>
- Chisti, Y. (2001). Hydrodynamic Damage to Animal Cells. *Critical Reviews in Biotechnology*, *21*(2), 67-110. <https://doi.org/10.1080/20013891081692>
- Chitnis, C. E., & Ohman, D. E. (1993). Genetic analysis of the alginate biosynthetic gene cluster of *Pseudomonas aeruginosa* shows evidence of an operonic structure. *Molecular Microbiology*, *8*(3), 583-590. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb01602.x>
- Chowdhury-Paul, S., Martínez-Ortíz, I. C., Pando-Robles, V., Moreno, S., Espín, G., Merino, E., & Núñez, C. (2023). The *Azotobacter vinelandii* AlgU regulon during vegetative growth and encysting conditions: A proteomic approach. *PLOS ONE*, *18*(11), e0286440. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0286440>
- Clarke, A. J., Strating, H., & Blackburn, N. T. (2002). Pathways for the O-Acetylation of Bacterial Cell Wall Polysaccharides. En R. J. Doyle (Ed.), *Glycomicrobiology* (pp. 187-223). Springer US. [https://doi.org/10.1007/0-306-46821-2\\_7](https://doi.org/10.1007/0-306-46821-2_7)
- Clementi, F. (1997). Alginate Production by *Azotobacter Vinelandii*. *Critical Reviews in Biotechnology*, *17*(4), 327-361. <https://doi.org/10.3109/07388559709146618>

Cocotl-Yañez, M., Moreno, S., Encarnación, S., López-Pliego, L., Castañeda, M., & Espín, G. (2014). A small heat-shock protein (Hsp20) regulated by RpoS is essential for cyst desiccation resistance in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiology*, 160(3), 479-487. <https://doi.org/10.1099/mic.0.073353-0>

Contreras-Abara, P., Castillo, T., Ponce, B., Urtuvia, V., Peña, C., & Díaz-Barrera, A. (2023). Continuous Bioproduction of Alginate Bacterial under Nitrogen Fixation and Nonfixation Conditions. *Fermentation*, 9(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/fermentation9050426>

Curran, S. J., & Black, R. A. (2004). Quantitative experimental study of shear stresses and mixing in progressive flow regimes within annular-flow bioreactors. *Chemical Engineering Science*, 59(24), 5859-5868. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2004.07.044>

Damiani, A. L., Kim, M. H., & Wang, J. (2014). An improved dynamic method to measure kLa in bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 111(10), 2120-2125. <https://doi.org/10.1002/bit.25258>

Demircan, H., & Oral, R. A. (2023). Parameters affecting calcium-alginate bead characteristics: Viscosity of hydrocolloids and water solubility of core material. *International Journal of Biological Macromolecules*, 236, 124011. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124011>

Dhamecha, D., Movsas, R., Sano, U., & Menon, J. U. (2019). Applications of alginate microspheres in therapeutics delivery and cell culture: Past, present and future. *International Journal of Pharmaceutics*, 569, 118627. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118627>

Diaz, A., & Acevedo, F. (1999). Scale-up strategy for bioreactors with Newtonian and non-Newtonian broths. *Bioprocess Engineering*, 21(1), 21-23. <https://doi.org/10.1007/s004490050634>

Díaz-Barrera, A., Aguirre, A., Berrios, J., & Acevedo, F. (2011). Continuous cultures for alginate production by *Azotobacter vinelandii* growing at different oxygen uptake rates. *Process Biochemistry*, 46(9), 1879-1883. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.06.022>

Díaz-Barrera, A., Andler, R., Martínez, I., & Peña, C. (2016). Poly-3-hydroxybutyrate production by *Azotobacter vinelandii* strains in batch cultures at different oxygen transfer rates. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 91(4), 1063-1071. <https://doi.org/10.1002/jctb.4684>

Díaz-Barrera, A., Gutierrez, J., Martínez, F., & Altamirano, C. (2014). Production of alginate by *Azotobacter vinelandii* grown at two bioreactor scales under oxygen-limited conditions. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 37(6), 1133-1140. <https://doi.org/10.1007/s00449-013-1084-2>

Díaz-Barrera, A., Martínez, F., Pezoa, F. G., & Acevedo, F. (2014). Evaluation of Gene Expression and Alginate Production in Response to Oxygen Transfer in Continuous Culture of *Azotobacter vinelandii*. *PLOS ONE*, 9(8), e105993. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105993>

Díaz-Barrera, A., Maturana, N., Pacheco-Leyva, I., Martínez, I., & Altamirano, C. (2017). Different responses in the expression of alginases, alginate polymerase and acetylation genes during alginate production by *Azotobacter vinelandii* under oxygen-controlled conditions. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 44(7), 1041-1051. <https://doi.org/10.1007/s10295-017-1929-9>

Díaz-Barrera, A., Peña, C., & Galindo, E. (2007). The oxygen transfer rate influences the molecular mass of the alginate produced by *Azotobacter vinelandii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(4), 903-910. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1060-3>

Díaz-Barrera, A., Sanchez-Rosales, F., Padilla-Córdova, C., Andler, R., & Peña, C. (2021). Molecular weight and guluronic/mannuronic ratio of alginate produced by *Azotobacter vinelandii* at two bioreactor scales under diazotrophic conditions. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 44(6), 1275-1287. <https://doi.org/10.1007/s00449-021-02532-8>

Díaz-Barrera, A., Silva, P., Ávalos, R., & Acevedo, F. (2009). Alginate molecular mass produced by *Azotobacter vinelandii* in response to changes of the O<sub>2</sub> transfer rate in chemostat cultures. *Biotechnology Letters*, 31(6), 825-829. <https://doi.org/10.1007/s10529-009-9949-9>

Díaz-Barrera, A., Silva, P., Berrios, J., & Acevedo, F. (2010). Manipulating the molecular weight of alginate produced by *Azotobacter vinelandii* in continuous cultures. *Bioresource Technology*, 101(23), 9405-9408. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.07.038>

Díaz-Barrera, A., Soto, E., & Altamirano, C. (2012). Alginate production and alg8 gene expression by *Azotobacter vinelandii* in continuous cultures. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 39(4), 613-621. <https://doi.org/10.1007/s10295-011-1055-z>

Donati, I., Holtan, S., Mørch, Y. A., Borgogna, M., & Dentini, M. (2005). New Hypothesis on the Role of Alternating Sequences in Calcium-Alginate Gels. *Biomacromolecules*, 6(2), 1031-1040. <https://doi.org/10.1021/bm049306e>

Donati, I., Mørch, Y. A., Strand, B. L., Skjåk-Bræk, G., & Paoletti, S. (2009). Effect of Elongation of Alternating Sequences on Swelling Behavior and Large Deformation Properties of Natural Alginate Gels. *The Journal of Physical Chemistry B*, 113(39), 12916-12922. <https://doi.org/10.1021/jp905488u>

Donati, I., Vetere, A., Gamini, A., Coslovi, A., Campa, C., & Paoletti, S. (2003). Galactose-Substituted Alginate: Preliminary Characterization and Study of Gelling Properties. *Biomacromolecules*, 4(3), 624-631. <https://doi.org/10.1021/bm020114y>

Draget, K. I., Skjåk Bræk, G., & Smidsrød, O. (1994). Alginic acid gels: The effect of alginate chemical composition and molecular weight. *Carbohydrate Polymers*, 25(1), 31-38. [https://doi.org/10.1016/0144-8617\(94\)90159-7](https://doi.org/10.1016/0144-8617(94)90159-7)

Ertesvåg, H. (2015). Alginate-modifying enzymes: Biological roles and biotechnological uses. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00523>

Ertesvåg, H., Sletta, H., Senneset, M., Sun, Y.-Q., Klinkenberg, G., Konradsen, T. A., Ellingsen, T. E., & Valla, S. (2017). Identification of genes affecting alginate biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens* by screening a transposon insertion library. *BMC Genomics*, 18(1), 11. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3467-7>

Ertesvåg, H., Valla, S., & Skjåk-Bræk, G. (2009). Enzymatic Alginate Modification. En B. H. A. Rehm (Ed.), *Alginates: Biology and Applications* (pp. 95-115). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-92679-5\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-540-92679-5_4)

Escobar, S., Rodriguez, A., Gomez, E., Alcon, A., Santos, V. E., & Garcia-Ochoa, F. (2016). Influence of oxygen transfer on *Pseudomonas putida* effects on growth rate and biodesulfurization capacity. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 39(4), 545-554. <https://doi.org/10.1007/s00449-016-1536-6>

Fabich, H. T., Vogt, S. J., Sherick, M. L., Seymour, J. D., Brown, J. R., Franklin, M. J., & Codd, S. L. (2012). Microbial and algal alginate gelation characterized by magnetic resonance. *Journal of Biotechnology*, 161(3), 320-327. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.04.016>

Fertah, M., Belfkira, A., Dahmane, E. montassir, Taourirte, M., & Brouillette, F. (2017). Extracción y caracterización de alginato de sodio del alga parda *Laminaria digitata de Marruecos*. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, S3707-S3714. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.05.003>

FILIPPOV, M., & R, K. (1974). DETERMINATION OF COMPOSITION OF ALGINATES BY INFRARED SPECTROSCOPIC METHOD. *DETERMINATION OF COMPOSITION OF ALGINATES BY INFRARED SPECTROSCOPIC METHOD*.

Flores, C., Díaz-Barrera, A., Martínez, F., Galindo, E., & Peña, C. (2015). Role of oxygen in the polymerization and de-polymerization of alginate produced by *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 90(3), 356-365. <https://doi.org/10.1002/jctb.4548>

Flores, C., Moreno, S., Espín, G., Peña, C., & Galindo, E. (2013). Expression of alginases and alginate polymerase genes in response to oxygen, and their relationship with the alginate molecular weight in *Azotobacter vinelandii*. *Enzyme and Microbial Technology*, 53(2), 85-91. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2013.04.010>

Franklin, M. J., Chitnis, C. E., Gacesa, P., Sonesson, A., White, D. C., & Ohman, D. E. (1994). *Pseudomonas aeruginosa* AlgG is a polymer level alginate C5-mannuronan epimerase. *Journal of Bacteriology*, 176(7), 1821-1830. <https://doi.org/10.1128/jb.176.7.1821-1830.1994>

Franklin, M. J., Nivens, D. E., Weadge, J. T., & Howell, P. L. (2011). Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* Extracellular Polysaccharides, Alginate, Pel, and Psl. *Frontiers in Microbiology*, 2. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00167>

Franklin, M. J., & Ohman, D. E. (1996). Identification of algI and algJ in the *Pseudomonas aeruginosa* alginate biosynthetic gene cluster which are required for alginate O acetylation. *Journal of Bacteriology*, 178(8), 2186-2195. <https://doi.org/10.1128/jb.178.8.2186-2195.1996>

Funes, C. F., Larach, A., Besoain, X., Serrano, D. D., Hadad, C., Pedreschi, R., Van Nhien, A. N., & Fuentealba, C. (2023). Active coatings based on oxidized chitin nanocrystals and silk fibroins for the control of anthracnose in 'Hass' avocados. *International Journal of Biological Macromolecules*, 253, 126673. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.126673>

Gaardløs, M., Heggeset, T. M. B., Tøndervik, A., Tezé, D., Svensson, B., Ertesvåg, H., Sletta, H., & Aachmann, F. L. (2022). Mechanistic Basis for Understanding the Dual Activities of the Bifunctional *Azotobacter vinelandii* Mannuronan C-5-Epimerase and Alginate Lyase AlgE7. *Applied and Environmental Microbiology*, 88(3), e01836-21. <https://doi.org/10.1128/aem.01836-21>

Gaardløs, M., Lervik, A., & Samsonov, S. A. (2023). Computational modeling of the molecular basis for the calcium-dependence of the mannuronan C-5 epimerase AvAlgE6 from *Azotobacter vinelandii*. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 21, 2188-2196. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2023.03.021>

Gaardløs, M., Samsonov, S. A., Sletmoen, M., Hjørnevik, M., Sætrom, G. I., Tøndervik, A., & Aachmann, F. L. (2021). Insights into the roles of charged residues in substrate binding and mode of action of mannuronan C-5 epimerase AlgE4. *Glycobiology*, 31(12), 1616-1635. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwab025>

Galindo, E., Peña, C., Núñez, C., Segura, D., & Espín, G. (2007). Molecular and bioengineering strategies to improve alginate and polyhydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii*. *Microbial Cell Factories*, 6(1), 7. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-6-7>

Gaona, G., Núñez, C., Goldberg, J. B., Linford, A. S., Nájera, R., Castañeda, M., Guzmán, J., Espín, G., & Soberón-Chávez, G. (2004). Characterization of the *Azotobacter vinelandii* algC gene involved in alginate and lipopolysaccharide production. *FEMS Microbiology Letters*, 238(1), 199-206. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2004.tb09756.x>

García, A., Castillo, T., Ramos, D., Ahumada-Manuel, C. L., Núñez, C., Galindo, E., Büchs, J., & Peña, C. (2020). Molecular weight and viscosifying power of alginates produced by mutant strains of *Azotobacter vinelandii* under microaerophilic conditions. *Biotechnology Reports*, 26, e00436. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00436>

García, A., Ferrer, P., Albiol, J., Castillo, T., Segura, D., & Peña, C. (2018). Metabolic flux analysis and the NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup> ratios in chemostat cultures of *Azotobacter vinelandii*. *Microbial Cell Factories*, 17(1), 10. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0860-8>

Garcia-Ochoa, F., Escobar, S., & Gomez, E. (2015). Specific oxygen uptake rate as indicator of cell response of *Rhodococcus erythropolis* cultures to shear effects. *Chemical Engineering Science*, 122, 491-499. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2014.10.016>

Garcia-Ochoa, F., & Gomez, E. (2009). Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. *Biotechnology Advances*, 27(2), 153-176. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.10.006>

Garcia-Ochoa, F., Gomez, E., Alcon, A., & Santos, V. E. (2013). The effect of hydrodynamic stress on the growth of *Xanthomonas campestris* cultures in a stirred and sparged tank bioreactor. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 36(7), 911-925. <https://doi.org/10.1007/s00449-012-0825-y>

Garcia-Ochoa, F., Gomez, E., & Santos, V. E. (2020). Fluid dynamic conditions and oxygen availability effects on microbial cultures in STBR: An overview. *Biochemical Engineering Journal*, 164, 107803. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107803>

Garcia-Ochoa, F., Gomez, E., Santos, V. E., & Merchuk, J. C. (2010). Oxygen uptake rate in microbial processes: An overview. *Biochemical Engineering Journal*, 49(3), 289-307. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2010.01.011>

Garcia-Ochoa, F., Santos, V. E., Gomez, E., Garcia-Ochoa, F., Santos, V. E., & Gomez, E. (2011). Stirred Tank Bioreactors. *COMPREHENSIVE BIOTECHNOLOGY, VOL 2: ENGINEERING FUNDAMENTALS OF BIOTECHNOLOGY, 2ND EDITION*, 179-198. <https://produccioncientifica.ucm.es/documentos/640cb1354531f424f87d173a>

Gaytán, I., Peña, C., Núñez, C., Córdova, M. S., Espín, G., & Galindo, E. (2012). *Azotobacter vinelandii* lacking the Na<sup>+</sup>-NQR activity: A potential source for producing alginates with improved properties and at high yield. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(8), 2731-2740. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1084-4>

Gelves, G. (2020). Simulating hydrodynamics in a Rushton turbine at different stirring velocities applied to non-Newtonian fluids. *Journal of Physics: Conference Series*, 1587(1), 012012. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1587/1/012012>

Germani, F., Nardini, M., De Schutter, A., Cuypers, B., Berghmans, H., Van Hauwaert, M.-L., Bruno, S., Mozzarelli, A., Moens, L., Van Doorslaer, S., Bolognesi, M., Pesce, A., & Dewilde, S. (2020). Structural and Functional Characterization of the Globin-Coupled Sensors of *Azotobacter vinelandii* and *Bordetella pertussis*. *Antioxidants & Redox Signaling*, 32(6), 378-395. <https://doi.org/10.1089/ars.2018.7690>

Gheorghita Puscaselu, R., Lobiuc, A., Dimian, M., & Covasa, M. (2020). Alginate: From Food Industry to Biomedical Applications and Management of Metabolic Disorders. *Polymers*, 12(10), Article 10. <https://doi.org/10.3390/polym12102417>

Gimmestad, M., Ertesvåg, H., Heggset, T. M. B., Aarstad, O., Svanem, B. I. G., & Valla, S. (2009). Characterization of Three New *Azotobacter vinelandii* Alginate Lyases, One of Which Is Involved in Cyst Germination. *Journal of Bacteriology*, 191(15), 4845-4853. <https://doi.org/10.1128/jb.00455-09>

Goh, C. H., Heng, P. W. S., & Chan, L. W. (2012). *Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications*

Gomez, E., Alcon, A., Escobar, S., Santos, V. E., & Garcia-Ochoa, F. (2015). Effect of fluiddynamic conditions on growth rate and biodesulfurization capacity of *Rhodococcus*

*erythropolis* IGTS8. *Biochemical Engineering Journal*, 99, 138-146.  
<https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.03.023>

Gomez, E., Santos, V. E., Alcon, A., Martin, A. B., & Garcia-Ochoa, F. (2006). Oxygen-Uptake and Mass-Transfer Rates on the Growth of *Pseudomonas putida* CECT5279: Influence on Biodesulfurization (BDS) Capability. *Energy & Fuels*, 20(4), 1565-1571.  
<https://doi.org/10.1021/ef050362y>

Gómez-Pazarín, K., Flores, C., Castillo, T., Büchs, J., Galindo, E., & Peña, C. (2016a). Molecular weight and viscosifying power of alginates produced in *Azotobacter vinelandii* cultures in shake flasks under low power input. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 91(5), 1485-1492. <https://doi.org/10.1002/jctb.4747>

Grant, G. T., Morris, E. R., Rees, D. A., Smith, P. J. C., & Thom, D. (1973). Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model. *FEBS Letters*, 32(1), 195-198. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(73\)80770-7](https://doi.org/10.1016/0014-5793(73)80770-7)

Guo, X., Wang, Y., Qin, Y., Shen, P., & Peng, Q. (2020). Structures, properties and application of alginic acid: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 162, 618-628.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.180>

Gutsche, S., Krause, M., & Kranz, H. (2008). Strategies to Overcome pH-Dependent Solubility of Weakly Basic Drugs by Using Different Types of Alginates. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 34(12), 1277-1284. <https://doi.org/10.1080/03639040802032895>

Hamilton, T. L., Ludwig, M., Dixon, R., Boyd, E. S., Dos Santos, P. C., Setubal, J. C., Bryant, D. A., Dean, D. R., & Peters, J. W. (2011). Transcriptional Profiling of Nitrogen Fixation in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*, 193(17), 4477-4486.  
<https://doi.org/10.1128/jb.05099-11>

Hao, X., Wang, Q., Zhang, X., Cao, Y., & Mark Loosdrecht, C. M. van. (2009). Experimental evaluation of decrease in bacterial activity due to cell death and activity decay in activated sludge. *Water Research*, 43(14), 3604-3612. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.05.019>

Hay, I. D., Rehman, Z. U., Moradali, M. F., Wang, Y., & Rhem, B. H. A. (2013). *Microbial alginate production, modification and its applications—Hay—2013—Microbial Biotechnology—Wiley Online Library*. <https://enviromicro-journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1751-7915.12076>

Hay, I. D., Remminghorst, U., & Rehm, B. H. A. (2009). MucR, a Novel Membrane-Associated Regulator of Alginate Biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(4), 1110-1120. <https://doi.org/10.1128/AEM.02416-08>

Hay, I. D., Ur Rehman, Z., Ghafoor, A., & Rehm, B. H. A. (2010). Bacterial biosynthesis of alginates. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 85(6), 752-759.  
<https://doi.org/10.1002/jctb.2372>

- Hecht, H., & Srebnik, S. (2016). Structural Characterization of Sodium Alginate and Calcium Alginate. *Biomacromolecules*, 17(6), 2160-2167. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.6b00378>
- Heldal, M., Norland, S., Fagerbakke, K. M., Thingstad, F., & Bratbak, G. (1996). The elemental composition of bacteria: A signature of growth conditions? *Marine Pollution Bulletin*, 33(1), 3-9. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(97\)00007-6](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(97)00007-6)
- Helmiyati, & Aprilliza, M. (2017). Characterization and properties of sodium alginate from brown algae used as an ecofriendly superabsorbent. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 188, 012019. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/188/1/012019>
- Hengge, R. (2008). The Two-Component Network and the General Stress Sigma Factor RpoS ( $\sigma$ S) in *Escherichia coli*. En R. Utsumi (Ed.), *Bacterial Signal Transduction: Networks and Drug Targets* (pp. 40-53). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-78885-2\\_4](https://doi.org/10.1007/978-0-387-78885-2_4)
- Hoefler, D., Schnepf, J. K., Hammer, T. R., Fischer, M., & Marquardt, C. (2015). Biotechnologically produced microbial alginate dressings show enhanced gel forming capacity compared to commercial alginate dressings of marine origin. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 26(4), 162. <https://doi.org/10.1007/s10856-015-5492-5>
- Høidal, H. K., Svanem, B. I. G., Gimmestad, M., & Valla, S. (2000a). Mannuronan C-5 epimerases and cellular differentiation of *Azotobacter vinelandii*. *Environmental Microbiology*, 2(1), 27-38. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2000.00074.x>
- Hoque, M., Alam, M., Wang, S., Zaman, J. U., Rahman, Md. S., Johir, M., Tian, L., Choi, J.-G., Ahmed, M. B., & Yoon, M.-H. (2023). Interaction chemistry of functional groups for natural biopolymer-based hydrogel design. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 156, 100758. <https://doi.org/10.1016/j.mser.2023.100758>
- Hu, C., Lu, W., Sun, C., Zhao, Y., Zhang, Y., & Fang, Y. (2022). Gelation behavior and mechanism of alginate with calcium: Dependence on monovalent counterions. *Carbohydrate Polymers*, 294, 119788. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119788>
- Huebsch, N., Arany, P. R., Mao, A. S., Shvartsman, D., Ali, O. A., Bencherif, S. A., Rivera-Feliciano, J., & Mooney, D. J. (2010). Harnessing traction-mediated manipulation of the cell/matrix interface to control stem-cell fate. *Nature Materials*, 9(6), 518-526. <https://doi.org/10.1038/nmat2732>
- Hurtado, A., Aljabali, A. A. A., Mishra, V., Tambuwala, M. M., & Serrano-Aroca, Á. (2022). Alginate: Enhancement Strategies for Advanced Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/ijms23094486>
- Inomura, K., Bragg, J., & Follows, M. J. (2017). A quantitative analysis of the direct and indirect costs of nitrogen fixation: A model based on *Azotobacter vinelandii*. *The ISME Journal*, 11(1), 166-175. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.97>
- Jain, S., Franklin, M. J., Ertesvåg, H., Valla, S., & Ohman, D. E. (2003). The dual roles of AlgG in C-5-epimerization and secretion of alginate polymers in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, 47(4), 1123-1133. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03361.x>

Jain, S., & Ohman, D. E. (2005). Role of an Alginate Lyase for Alginate Transport in Mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity*, 73(10), 6429-6436. <https://doi.org/10.1128/iai.73.10.6429-6436.2005>

Jendrossek, D., & Handrick, R. (2002). Microbial Degradation of Polyhydroxyalkanoates\*. *Annual Review of Microbiology*, 56(Volume 56, 2002), 403-432. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160838>

Jiménez, L., Castillo, T., Flores, C., Galindo, E., & Peña, C. (2016). *Analysis of respiratory activity and carbon usage of a mutant of Azotobacter vinelandii impaired in poly-β-hydroxybutyrate synthesis* | *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* | Oxford Academic.

Ju, L.-K., & Chase, G. G. (1992). Improved scale-up strategies of bioreactors. *Bioprocess Engineering*, 8(1), 49-53. <https://doi.org/10.1007/BF00369263>

Kaila, V. R. I., & Wikström, M. (2021). Architecture of bacterial respiratory chains. *Nature Reviews Microbiology*, 19(5), 319-330. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00486-4>

Kanasan, N., Adzila, S., AzimahMustaffa, N., & Gurubaran, P. (2017). The Effect of Sodium Alginate on the Properties of Hydroxyapatite. *Procedia Engineering*, 184, 442-448. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2017.04.115>

Keiski, C.-L., Harwich, M., Jain, S., Neculai, A. M., Yip, P., Robinson, H., Whitney, J. C., Riley, L., Burrows, L. L., Ohman, D. E., & Howell, P. L. (2010). AlgK Is a TPR-Containing Protein and the Periplasmic Component of a Novel Exopolysaccharide Secretin. *Structure*, 18(2), 265-273. <https://doi.org/10.1016/j.str.2009.11.015>

Khanra, S., Mondal, M., & Halder, G. (2018). *Downstream processing of microalgae for pigments, protein and carbohydrate in industrial application: A review*

Klimek, J., & Ollis, D. F. (1980). Extracellular microbial polysaccharides: Kinetics of *Pseudomonas* sp., *Azotobacter vinelandii*, and *Aureobasidium pullulans* batch fermentations. *Biotechnology and Bioengineering*, 22(11), 2321-2342. <https://doi.org/10.1002/bit.260221109>

Krishna, D. V., & Sankar, M. R. (2023). Extrusion based bioprinting of alginate based multicomponent hydrogels for tissue regeneration applications: State of the art. *Materials Today Communications*, 35, 105696. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2023.105696>

Kuhla, J., & Oelze, J. (1988). Dependence of nitrogenase switch-off upon oxygen stress on the nitrogenase activity in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*, 170(11), 5325-5329. <https://doi.org/10.1128/jb.170.11.5325-5329.1988>

Larsen, C. K., Gåserød, O., & Smidsrød, O. (2003). A novel method for measuring hydration and dissolution kinetics of alginate powders. *Carbohydrate Polymers*, 51(2), 125-134. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(02\)00139-X](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(02)00139-X)

Lee, J. W., & Day, F. (1998). The separation of alginate biosynthesis and acetylation in *Pseudomonas syringae*. *Canadian Journal of Microbiology*, 44(4), 394-398. <https://doi.org/10.1139/w98-008>

Lee, K. Y., & Mooney, D. J. (2012a). Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 37(1), 106-126. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003>

Leid, J. G., Willson, C. J., Shirliff, M. E., Hassett, D. J., Parsek, M. R., & Jeffers, A. K. (2005). The Exopolysaccharide Alginate Protects *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Bacteria from IFN- $\gamma$ -Mediated Macrophage Killing<sup>1</sup>. *The Journal of Immunology*, 175(11), 7512-7518. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.11.7512>

León, R., & Espín, G. (2008). flhDC, but not fleQ, regulates flagella biogenesis in *Azotobacter vinelandii*, and is under AlgU and CydR negative control. *Microbiology*, 154(6), 1719-1728. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2008/017665-0>

Liang, Z., Rybtke, M., Kragh, K. N., Johnson, O., Schicketanz, M., Zhang, Y. E., Andersen, J. B., & Tolker-Nielsen, T. (2022). Transcription of the Alginate Operon in *Pseudomonas aeruginosa* Is Regulated by c-di-GMP. *Microbiology Spectrum*, 10(4), e00675-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00675-22>

Liew, C. V., Chan, L. W., Ching, A. L., & Heng, P. W. S. (2006). Evaluation of sodium alginate as drug release modifier in matrix tablets. *International Journal of Pharmaceutics*, 309(1), 25-37. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.10.040>

Liu, J., Yang, S., Li, X., Yan, Q., Reaney, M. J. T., & Jiang, Z. (2019). Alginate Oligosaccharides: Production, Biological Activities, and Potential Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(6), 1859-1881. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12494>

Liu, Q., Lin, Z., Zhang, Y., Li, Y., Wang, Z., & Chen, T. (2014). Improved poly(3-hydroxybutyrate) production in *Escherichia coli* by inactivation of cytochrome bd-II oxidase or/and NDH-II dehydrogenase in low efficient respiratory chains. *Journal of Biotechnology*, 192, 170-176. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.09.021>

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*, 25(4), 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

Loewen, P. C., Hu, B., Strutinsky, J., & Sparling, R. (1998). Regulation in the rpoS regulon of *Escherichia coli*. *Canadian Journal of Microbiology*, 44(8), 707-717. <https://doi.org/10.1139/w98-069>

López-Pliego, L., Mena-Muñoz, G., Terán-Melo, J. L., Fuentes, L. E., Núñez, C. E., & Castañeda, M. (2020). Study of the sRNA RsmY involved in the genetic regulation of the synthesis of alginate and alkyl resorcinols in *Azotobacter vinelandii*. *Archives of Microbiology*, 202(3), 579-589. <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01769-y>

Lozano, E., Galindo, E., & Peña, C. F. (2011). Oxygen transfer rate during the production of alginate by *Azotobacter vinelandii* under oxygen-limited and non oxygen-limited conditions. *Microbial Cell Factories*, 10(1), 13. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-13>

Lu, Y., Chen, J., Wang, R., Xu, P., Zhang, X., Gao, B., Guo, C., & Yang, G. (2019). Bio-inspired Cu-alginate to smartly enhance safety performance and the thermal decomposition of ammonium perchlorate. *Applied Surface Science*, 470, 269-275. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2018.11.108>

Mærk, M., Jakobsen, Ø. M., Sletta, H., Klinkenberg, G., Tøndervik, A., Ellingsen, T. E., Valla, S., & Ertesvåg, H. (2020). Identification of Regulatory Genes and Metabolic Processes Important for Alginate Biosynthesis in *Azotobacter vinelandii* by Screening of a Transposon Insertion Mutant Library. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00475>

Maier, U., & Büchs, J. (2001). Characterisation of the gas–liquid mass transfer in shaking bioreactors. *Biochemical Engineering Journal*, 7(2), 99-106. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(00\)00107-8](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(00)00107-8)

Maleki, S., Mærk, M., Hrudikova, R., Valla, S., & Ertesvåg, H. (2017). New insights into *Pseudomonas fluorescens* alginate biosynthesis relevant for the establishment of an efficient production process for microbial alginates. *New Biotechnology*, 37, 2-8. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.08.005>

Martău, G. A., Mihai, M., & Vodnar, D. C. (2019). The Use of Chitosan, Alginate, and Pectin in the Biomedical and Food Sector—Biocompatibility, Bioadhesiveness, and Biodegradability. *Polymers*, 11(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/polym11111837>

Martin del Campo, J. S., Rigsbee, J., Bueno Batista, M., Mus, F., Rubio, L. M., Einsle, O., Peters, J. W., Dixon, R., Dean, D. R., & Dos Santos, P. C. (2022). Overview of physiological, biochemical, and regulatory aspects of nitrogen fixation in *Azotobacter vinelandii*. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 57(5-6), 492-538. <https://doi.org/10.1080/10409238.2023.2181309>

Martínez-Ortiz, I. C., Ahumada-Manuel, C. L., Hsueh, B. Y., Guzmán, J., Moreno, S., Cocotl-Yañez, M., Waters, C. M., Zamorano-Sánchez, D., Espín, G., & Núñez, C. (2020). Cyclic di-GMP-Mediated Regulation of Extracellular Mannuronan C-5 Epimerases Is Essential for Cyst Formation in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*, 202(24), 10.1128/jb.00135-20. <https://doi.org/10.1128/jb.00135-20>

Martínez-Salazar, J. M., Moreno, S., Nájera, R., Boucher, J. C., Espín, G., Soberón-Chávez, G., & Deretic, V. (1996). Characterization of the genes coding for the putative sigma factor AlgU and its regulators MucA, MucB, MucC, and MucD in *Azotobacter vinelandii* and evaluation of their roles in alginate biosynthesis. *Journal of Bacteriology*, 178(7), 1800-1808. <https://doi.org/10.1128/jb.178.7.1800-1808.1996>

Maynard, R. H., Premakumar, R., & Bishop, P. E. (1994). Mo-independent nitrogenase 3 is advantageous for diazotrophic growth of *Azotobacter vinelandii* on solid medium containing

molybdenum. *Journal of Bacteriology*, 176(17), 5583-5586.  
<https://doi.org/10.1128/jb.176.17.5583-5586.1994>

McRose, D. L., Baars, O., Morel, F. M. M., & Kraepiel, A. M. L. (2017). Siderophore production in *Azotobacter vinelandii* in response to Fe-, Mo- and V-limitation. *Environmental Microbiology*, 19(9), 3595-3605. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13857>

Medina, A., Castillo, T., Flores, C., Núñez, C., Galindo, E., & Peña, C. (2023). Production of alginates with high viscosifying power and molecular weight by using the AT9 strain of *Azotobacter vinelandii* in batch cultures under different oxygen transfer conditions. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 98(2), 537-543. <https://doi.org/10.1002/jctb.7267>

Mejía-Ruiz, H., Guzmán, J., Moreno, S., Soberón-Chávez, G., & Espín, G. (1997). The *Azotobacter vinelandii* *alg8* and *alg44* genes are essential for alginate synthesis and can be transcribed from an *algD*-independent promoter. *Gene*, 199(1), 271-277. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(97\)00380-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(97)00380-6)

Merighi, M., Lee, V. T., Hyodo, M., Hayakawa, Y., & Lory, S. (2007). The second messenger bis-(3'-5')-cyclic-GMP and its PilZ domain-containing receptor Alg44 are required for alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, 65(4), 876-895. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05817.x>

Mok, P.-S., Chuah, J.-A., Najimudin, N., Liew, P.-W.-Y., Jong, B.-C., & Sudesh, K. (2021). In Vivo Characterization and Application of the PHA Synthase from *Azotobacter vinelandii* for the Biosynthesis of Polyhydroxyalkanoate Containing 4-Hydroxybutyrate. *Polymers*, 13(10), Article 10. <https://doi.org/10.3390/polym13101576>

Moradali, M. F., Donati, I., Sims, I. M., Ghods, S., & Rehm, B. H. A. (2015). Alginate Polymerization and Modification Are Linked in *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio*, 6(3), 10.1128/mbio.00453-15. <https://doi.org/10.1128/mbio.00453-15>

Moradali, M. F., Ghods, S., & Rehm, B. H. A. (2017). Activation Mechanism and Cellular Localization of Membrane-Anchored Alginate Polymerase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(9), e03499-16. <https://doi.org/10.1128/AEM.03499-16>

Moradali, M. F., Ghods, S., & Rehm, B. H. A. (2018). Alginate Biosynthesis and Biotechnological Production. En B. H. A. Rehm & M. F. Moradali (Eds.), *Alginates and Their Biomedical Applications* (pp. 1-25). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-6910-9\\_1](https://doi.org/10.1007/978-981-10-6910-9_1)

Moradali, M. F., & Rehm, B. H. A. (2020). The Regulation of Alginate Biosynthesis via Cyclic di-GMP Signaling. En S.-H. Chou, N. Guiliani, V. T. Lee, & U. Römling (Eds.), *Microbial Cyclic Di-Nucleotide Signaling* (pp. 223-238). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-33308-9\\_14](https://doi.org/10.1007/978-3-030-33308-9_14)

Moreno, S., Ertesvåg, H., Valla, S., Núñez, C., Espin, G., & Cocotl-Yañez, M. (2018). RpoS controls the expression and the transport of the AlgE1-7 epimerases in *Azotobacter vinelandii*. *FEMS Microbiology Letters*, 365(19). <https://doi.org/10.1093/femsle/fny210>

- Murrieta-Dueñas, R., Alvarado-Rodríguez, C. E., Cortez-González, J., & Gutierrez-Guerra, R. (2022). Numerical Analysis of Impellers Hydrodynamics Performance in a Bioreactor CSTR with SPH. En L. Montastruc & S. Negny (Eds.), *Computer Aided Chemical Engineering* (Vol. 51, pp. 559-564). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-95879-0.50094-1>
- Natzke, J., Noar, J., & Bruno-Bárcena, J. M. (2018). *Azotobacter vinelandii* Nitrogenase Activity, Hydrogen Production, and Response to Oxygen Exposure. *Applied and Environmental Microbiology*, *84*(16), e01208-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.01208-18>
- Nivens, D. E., Ohman, D. E., Williams, J., & Franklin, M. J. (2001). Role of Alginate and Its O Acetylation in Formation of *Pseudomonas aeruginosa* Microcolonies and Biofilms. *Journal of Bacteriology*, *183*(3), 1047-1057. <https://doi.org/10.1128/jb.183.3.1047-1057.2001>
- Noar, J. D., & Bruno-Bárcena, J. M. (2018). *Azotobacter vinelandii*: The source of 100 years of discoveries and many more to come. *Microbiology*, *164*(4), 421-436. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000643>
- Núñez, C., Bogachev, A. V., Guzmán, G., Tello, I., Guzmán, J., & Espín, G. (2009). The Na<sup>+</sup>-translocating NADH: Ubiquinone oxidoreductase of *Azotobacter vinelandii* negatively regulates alginate synthesis. *Microbiology*, *155*(1), 249-256. <https://doi.org/10.1099/mic.0.022533-0>
- Núñez, C., López-Pliego, L., Ahumada-Manuel, C. L., & Castañeda, M. (2022). Genetic Regulation of Alginate Production in *Azotobacter vinelandii* a Bacterium of Biotechnological Interest: A Mini-Review. *Frontiers in Microbiology*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.845473>
- Oelze, J. (2000). Respiratory protection of nitrogenase in *Azotobacter* species: Is a widely held hypothesis unequivocally supported by experimental evidence? *FEMS Microbiology Reviews*, *24*(4), 321-333. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00545.x>
- Oglesby, L. L., Jain, S., & Ohman, D. E. (2008). Membrane topology and roles of *Pseudomonas aeruginosa* Alg8 and Alg44 in alginate polymerization. *Microbiology*, *154*(6), 1605-1615. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/015305-0>
- Olmos, E., Mehmood, N., Haj Husein, L., Goergen, J.-L., Fick, M., & Delaunay, S. (2013). Effects of bioreactor hydrodynamics on the physiology of *Streptomyces*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, *36*(3), 259-272. <https://doi.org/10.1007/s00449-012-0794-1>
- Pacheco-Leyva, I., Guevara Pezoa, F., & Díaz-Barrera, A. (2016). Alginate Biosynthesis in *Azotobacter vinelandii*: Overview of Molecular Mechanisms in Connection with the Oxygen Availability. *International Journal of Polymer Science*, *2016*(1), 2062360. <https://doi.org/10.1155/2016/2062360>
- Padilla-Córdova, C., Mongili, B., Contreras, P., Fino, D., Tommasi, T., & Díaz-Barrera, A. (2020). Productivity and scale-up of poly(3-hydroxybutyrate) production under different oxygen transfer conditions in cultures of *AZOTOBACTER VINELANDII*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, *95*(11), 3034-3040. <https://doi.org/10.1002/jctb.6465>

Page, W. J. (1995). Bacterial polyhydroxyalkanoates, natural biodegradable plastics with a great future. *Canadian Journal of Microbiology*, 41(13), 1-3. <https://doi.org/10.1139/m95-161>

Patel, N., & Thibault, J. (2009). Enhanced in situ dynamic method for measuring *K<sub>L</sub>a* in fermentation media. *Biochemical Engineering Journal*, 47(1), 48-54. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.07.001>

Patil, S. V., Mohite, B. V., Patil, C. D., Koli, S. H., Borase, H. P., & Patil, V. S. (2020). Chapter 19—Azotobacter. En N. Amaresan, M. Senthil Kumar, K. Annapurna, K. Kumar, & A. Sankaranarayanan (Eds.), *Beneficial Microbes in Agro-Ecology* (pp. 397-426). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823414-3.00019-8>

Pawar, S. N., & Edgar, K. J. (2012). Alginate derivatization: A review of chemistry, properties and applications. *Biomaterials*, 33(11), 3279-3305. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.01.007>

Peng, W., Li, D., Dai, K., Wang, Y., Song, P., Li, H., Tang, P., Zhang, Z., Li, Z., Zhou, Y., & Zhou, C. (2022). Recent progress of collagen, chitosan, alginate and other hydrogels in skin repair and wound dressing applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 208, 400-408. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.03.002>

Peña, C., Campos, N., & Galindo, E. (1997). Changes in alginate molecular mass distributions, broth viscosity and morphology of *Azotobacter vinelandii* cultured in shake flasks. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48(4), 510-515. <https://doi.org/10.1007/s002530051088>

Peña C, Galindo, E., & Büchs, J. (2011). The viscosifying power, degree of acetylation and molecular mass of the alginate produced by *Azotobacter vinelandii* in shake flasks are determined by the oxygen transfer rate. *Process Biochemistry*, 46(1), 290-297. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.08.025>

Peña, C., Hernández, L., & Galindo, E. (2006). Manipulation of the acetylation degree of *Azotobacter vinelandii* alginate by supplementing the culture medium with 3-(N-morpholino)-propane-sulfonic acid. *Letters in Applied Microbiology*, 43(2), 200-204. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01925.x>

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 and Microbial Technology*, 27(6), 390-398. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(00\)00221-0](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(00)00221-0)

Petersen, A. B., Tøndervik, A., Gaardløs, M., Ertesvåg, H., Sletta, H., & Aachmann, F. L. (2023). Mannuronate C-5 epimerases and their use in alginate modification. *Essays in Biochemistry*, 67(3), 615-627. <https://doi.org/10.1042/EBC20220151>

Pinelli, D. (2007). The role of small bubbles in gas–liquid mass transfer in stirred vessels and assessment of a two-fraction model for noncoalescent or moderately viscous liquids. *Chemical Engineering Science*, 62(14), 3767-3776. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2007.03.024>

- Ponce, B., Urtuvia, V., Maturana, N., Peña, C., & Díaz-Barrera, A. (2021b). Increases in alginate production and transcription levels of alginate lyase (*alyA1*) by control of the oxygen transfer rate in *Azotobacter vinelandii* cultures under diazotrophic conditions. *Electronic Journal of Biotechnology*, 52, 35-44. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2021.04.007>
- Poole, R. K., & Hill, S. (1997). Respiratory Protection of Nitrogenase Activity in *Azotobacter vinelandii*—Roles of the Terminal Oxidases. *Bioscience Reports*, 17(3), 303-317. <https://doi.org/10.1023/A:1027336712748>
- Potter, K., Balcom, B. J., Carpenter, T. A., & Hall, L. D. (1994). The gelation of sodium alginate with calcium ions studied by magnetic resonance imaging (MRI). *Carbohydrate Research*, 257(1), 117-126. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(94\)84112-8](https://doi.org/10.1016/0008-6215(94)84112-8)
- Price, E. E., Román-Rodríguez, F., & Boyd, J. M. (2021). Bacterial approaches to sensing and responding to respiration and respiration metabolites. *Molecular Microbiology*, 116(4), 1009-1021. <https://doi.org/10.1111/mmi.14795>
- Pruteanu, M., & Hengge-Aronis, R. (2002). The cellular level of the recognition factor RssB is rate-limiting for  $\sigma$ S proteolysis: Implications for RssB regulation and signal transduction in  $\sigma$ S turnover in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 45(6), 1701-1713. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03123.x>
- Puguan, J. M. C., Yu, X., & Kim, H. (2014). Characterization of structure, physico-chemical properties and diffusion behavior of Ca-Alginate gel beads prepared by different gelation methods. *Journal of Colloid and Interface Science*, 432, 109-116. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2014.06.048>
- Puthli, M. S., Rathod, V. K., & Pandit, A. B. (2005). Gas-liquid mass transfer studies with triple impeller system on a laboratory scale bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, 23(1), 25-30. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2004.10.006>
- Pyla, R., Kim, T.-J., Silva, J. L., & Jung, Y.-S. (2009). Overproduction of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate in the *Azotobacter vinelandii* mutant that does not express small RNA ArrF. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(4), 717-724. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2002-z>
- Qin, Y., Jiang, J., Zhao, L., Zhang, J., & Wang, F. (2018). Chapter 13—Applications of Alginate as a Functional Food Ingredient. En A. M. Grumezescu & A. M. Holban (Eds.), *Biopolymers for Food Design* (pp. 409-429). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811449-0.00013-X>
- Quiroz-Rocha, E., Bonilla-Badía, F., García-Aguilar, V., López-Pliego, L., Serrano-Román, J., Cocotl-Yañez, M., Guzmán, J., Ahumada-Manuel, C. L., Muriel-Millán, L. F., Castañeda, M., Espín, G., & Nuñez, C. (2017). Two-component system CbrA/CbrB controls alginate production in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiology*, 163(7), 1105-1115. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000457>

- Rashidzadeh, A., Olad, A., & Reyhanitabar, A. (2015). Hydrogel/clinoptilolite nanocomposite-coated fertilizer: Swelling, water-retention and slow-release fertilizer properties. *Polymer Bulletin*, 72(10), 2667-2684. <https://doi.org/10.1007/s00289-015-1428-y>
- Rashidzadeh, B., Shokri, E., Mahdavinia, G. R., Moradi, R., Mohamadi-Aghdam, S., & Abdi, S. (2020). Preparation and characterization of antibacterial magnetic-/pH-sensitive alginate/Ag/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> hydrogel beads for controlled drug release. *International Journal of Biological Macromolecules*, 154, 134-141. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.028>
- Remminghorst, U., & Rehm, B. H. A. (2006). Bacterial alginates: From biosynthesis to applications. *Biotechnology Letters*, 28(21), 1701-1712. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9156-x>
- Reynoso-Cereceda, G. I., Córdova-Aguilar, M. S., Valdez-Cruz, N. A., & Trujillo-Roldán, M. A. (2018). Shaken flasks by resonant acoustic mixing in the biosynthesis of alginate by *Azotobacter vinelandii* with non-Newtonian rheological characteristics. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 93(4), 1159-1168. <https://doi.org/10.1002/jctb.5475>
- Richardson, D. J. (2000). Bacterial respiration: A flexible process for a changing environment 1999 Fleming Lecture (Delivered at the 144th meeting of the Society for General Microbiology, 8 September 1999). *Microbiology*, 146(3), 551-571. <https://doi.org/10.1099/00221287-146-3-551>
- Rinaudo, M. (2008). Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. *Polymer International*, 57(3), 397-430. <https://doi.org/10.1002/pi.2378>
- Robles-Price, A., Wong, T. Y., Sletta, H., Valla, S., & Schiller, N. L. (2004). AlgX Is a Periplasmic Protein Required for Alginate Biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 186(21), 7369-7377. <https://doi.org/10.1128/jb.186.21.7369-7377.2004>
- Rodríguez, A., Santos, V. E., Gomez, E., & Garcia-Ochoa, F. (2017). Influence of fluid dynamic conditions on 1,3-propanediol production from glycerol by *Shimwellia blattae*: Carbon flux and cell response. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 92(8), 2050-2059. <https://doi.org/10.1002/jctb.5200>
- Rodríguez-Martínez, K., Muriel-Millán, L. F., Ortiz-Vasco, C., Moreno, S., Soberón-Chávez, G., & Espín, G. (2023). Defining the regulatory mechanisms of sigma factor RpoS degradation in *Azotobacter vinelandii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, 120(1), 91-102. <https://doi.org/10.1111/mmi.15107>
- Römling, U., Galperin, M. Y., & Gomelsky, M. (2013). Cyclic di-GMP: The First 25 Years of a Universal Bacterial Second Messenger. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(1), 1-52. <https://doi.org/10.1128/mubr.00043-12>
- Romo-Urbe, A., Meneses-Acosta, A., & Domínguez-Díaz, M. (2017). Viability of HEK 293 cells on poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) biosynthesized from a mutant *Azotobacter vinelandii* strain. Cast film and electrospun scaffolds. *Materials Science and Engineering: C*, 81, 236-246. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.07.045>

Roohi, Zaheer, M. R., & Kuddus, M. (2018). PHB (poly- $\beta$ -hydroxybutyrate) and its enzymatic degradation. *Polymers for Advanced Technologies*, 29(1), 30-40. <https://doi.org/10.1002/pat.4126>

Rosales-Cruz, A., Reyes-Nicolau, J., Minto-González, E., Meneses-Carbajal, A., Mondragón-Albarrán, C., López-Pliego, L., & Castañeda, M. (2024). A Homolog of the Histidine Kinase RetS Controls the Synthesis of Alginates, PHB, Alkylresorcinols, and Motility in *Azotobacter vinelandii*. *Current Microbiology*, 81(10), 311. <https://doi.org/10.1007/s00284-024-03835-1>

Sabra, W., Zeng, A.-P., Lünsdorf, H., & Deckwer, W.-D. (2000). Effect of Oxygen on Formation and Structure of *Azotobacter vinelandii* Alginate and Its Role in Protecting Nitrogenase. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(9), 4037-4044. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.9.4037-4044.2000>

Sahoo, D. R., & Biswal, T. (2021). Alginate and its application to tissue engineering. *SN Applied Sciences*, 3(1), 30. <https://doi.org/10.1007/s42452-020-04096-w>

Sanchez-Ballester, N. M., Bataille, B., & Soulairol, I. (2021). Sodium alginate and alginic acid as pharmaceutical excipients for tablet formulation: Structure-function relationship. *Carbohydrate Polymers*, 270, 118399. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118399>

Sandercock, J. R., & Page, W. J. (2008). RpoS Expression and the General Stress Response in *Azotobacter vinelandii* during Carbon and Nitrogen Diauxic Shifts. *Journal of Bacteriology*, 190(3), 946-953. <https://doi.org/10.1128/jb.01571-06>

Sartori, C., Finch, D. S., Ralph, B., & Gilding, K. (1997). Determination of the cation content of alginate thin films by FTi.r. Spectroscopy. *Polymer*, 38(1), 43-51. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(96\)00458-2](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(96)00458-2)

Scargiali, F., Busciglio, A., Grisafi, F., & Brucato, A. (2010). Simplified dynamic pressure method for  $k_La$  measurement in aerated bioreactors. *Biochemical Engineering Journal*, 49(2), 165-172. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.12.008>

Schipani, R., Scheurer, S., Florentin, R., Critchley, S. E., & Kelly, D. J. (2020). Reinforcing interpenetrating network hydrogels with 3D printed polymer networks to engineer cartilage mimetic composites. *Biofabrication*, 12(3), 035011. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/ab8708>

Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3(6), 1101-1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>

Segale, L., Giovannelli, L., Mannina, P., & Pattarino, F. (2016). Calcium Alginate and Calcium Alginate-Chitosan Beads Containing Celecoxib Solubilized in a Self-Emulsifying Phase. *Scientifica*, 2016(1), 5062706. <https://doi.org/10.1155/2016/5062706>

Senior, P. J., & Dawes, E. A. (1973). The regulation of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. *Biochemical Journal*, 134(1), 225-238. <https://doi.org/10.1042/bj1340225>

Senturk Parreidt, T., Müller, K., & Schmid, M. (2018). Alginate-Based Edible Films and Coatings for Food Packaging Applications. *Foods*, 7(10), Article 10. <https://doi.org/10.3390/foods7100170>

Setubal, J. C., dos Santos, P., Goldman, B. S., Ertesvåg, H., Espin, G., Rubio, L. M., Valla, S., Almeida, N. F., Balasubramanian, D., Cromes, L., Curatti, L., Du, Z., Godsy, E., Goodner, B., Hellner-Burris, K., Hernandez, J. A., Houmiel, K., Imperial, J., Kennedy, C., ... Wood, D. (2009). Genome Sequence of *Azotobacter vinelandii*, an Obligate Aerobe Specialized To Support Diverse Anaerobic Metabolic Processes. *Journal of Bacteriology*, 191(14), 4534-4545. <https://doi.org/10.1128/jb.00504-09>

Silva, E. A., & Mooney, D. J. (2010). Effects of VEGF temporal and spatial presentation on angiogenesis. *Biomaterials*, 31(6), 1235-1241. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.10.052>

Skjåk-Bræk, G., Zanetti, F., & Paoletti, S. (1989). Effect of acetylation on some solution and gelling properties of alginates. *Carbohydrate Research*, 185(1), 131-138. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(89\)84028-5](https://doi.org/10.1016/0008-6215(89)84028-5)

Skjåk-Bræk, G., Grasdalen, H., & Larsen, B. (1986). *Monomer sequence and acetylation pattern in some bacterial alginates—ScienceDirect*. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0008621500900363>

Skjåk-Bræk, G., Larsen, B., & Grasdalen, H. (1985). The role of O-acetyl groups in the biosynthesis of alginate by *Azotobacter vinelandii*. *Carbohydrate Research*, 145(1), 169-174. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)90427-0](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)90427-0)

Stanisci, A., Tøndervik, A., Gaardløs, M., Lervik, A., Skjåk-Bræk, G., Sletta, H., & Aachmann, F. L. (2020). Identification of a Pivotal Residue for Determining the Block Structure-Forming Properties of Alginate C-5 Epimerases. *ACS Omega*, 5(8), 4352-4361. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b04490>

Sun, J., & Tan, H. (2013). Alginate-Based Biomaterials for Regenerative Medicine Applications. *Materials*, 6(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/ma6041285>

Svanem, B. I. G., Strand, W. I., Ertesvåg, H., Skjåk-Bræk, G., Hartmann, M., Barbeyron, T., & Valla, S. (2001). The Catalytic Activities of the Bifunctional *Azotobacter vinelandii* Mannuronan C-5-Epimerase and Alginate Lyase AlgE7 Probably Originate from the Same Active Site in the Enzyme \*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(34), 31542-31550. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102562200>

Szekalska, M., Puciłowska, A., Szymańska, E., Ciosek, P., & Winnicka, K. (2016a). Alginate: Current Use and Future Perspectives in Pharmaceutical and Biomedical Applications. *International Journal of Polymer Science*, 2016(1), 7697031. <https://doi.org/10.1155/2016/7697031>

Szekalska, M., Puciłowska, A., Szymańska, E., Ciosek, P., & Winnicka, K. (2016b). Alginate: Current Use and Future Perspectives in Pharmaceutical and Biomedical Applications.

*International Journal of Polymer Science*, 2016(1), 7697031.  
<https://doi.org/10.1155/2016/7697031>

Talaat, A. M. (2012). Single-Cell Elemental Analysis of Bacteria: Quantitative Analysis of Polyphosphates in *Mycobacterium tuberculosis*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00063>

Tavares, I. M., Leitão, J. H., Fialho, A. M., & Sá-Correia, I. (1999). Pattern of changes in the activity of enzymes of GDP-D-mannuronic acid synthesis and in the level of transcription of algA, algC and algD genes accompanying the loss and emergence of mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*. *Research in Microbiology*, 150(2), 105-116. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(99\)80028-X](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(99)80028-X)

Tavassoli-Kafrani, E., Shekarchizadeh, H., & Masoudpour-Behabadi, M. (2016). Development of edible films and coatings from alginates and carrageenans. *Carbohydrate Polymers*, 137, 360-374. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.10.074>

Thakur, S., Sharma, B., Verma, A., Chaudhary, J., Tamulevicius, S., & Thakur, V. K. (2018). Recent progress in sodium alginate based sustainable hydrogels for environmental applications. *Journal of Cleaner Production*, 198, 143-159. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.06.259>

Tomić, S. L., Babić Radić, M. M., Vuković, J. S., Filipović, V. V., Nikodinovic-Runic, J., & Vukomanović, M. (2023). Alginate-Based Hydrogels and Scaffolds for Biomedical Applications. *Marine Drugs*, 21(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/md21030177>

Tønnesen, 15 Altmetric Listen Research Article Alginate in Drug Delivery Systems Hanne Hjorth, & Karlsen, J. (2002). *Full article: Alginate in Drug Delivery Systems*. <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1081/DDC-120003853>

Trujillo-Roldán, M. A., Monsalve-Gil, J. F., Cuesta-álvarez, A. M., & Valdez-Cruz, N. A. (2015). The production, molecular weight and viscosifying power of alginate produced by *Azotobacter vinelandii* is affected by the carbon source in submerged cultures. *DYNA*, 82(194), 21-26. <https://doi.org/10.15446/dyna.v82n194.44201>

Urtuvia, V., Maturana, N., Acevedo, F., Peña, C., & Díaz-Barrera, A. (2017). Bacterial alginate production: An overview of its biosynthesis and potential industrial production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(11), 1-10. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2363-x>

Valla, S., Li, J., Ertesvåg, H., Barbeyron, T., & Lindahl, U. (2001). Hexuronyl C5-epimerases in alginate and glycosaminoglycan biosynthesis. *Biochimie*, 83(8), 819-830. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(01\)01313-X](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(01)01313-X)

Van't Riet, K. (1979). Review of Measuring Methods and Results in Nonviscous Gas-Liquid Mass Transfer in Stirred Vessels. *Industrial & Engineering Chemistry Process Design and Development*, 18(3), 357-364. <https://doi.org/10.1021/i260071a001>

Varaprasad, K., Jayaramudu, T., Kanikireddy, V., Toro, C., & Sadiku, E. R. (2020). Alginate-based composite materials for wound dressing application: A mini review. *Carbohydrate Polymers*, 236, 116025. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116025>

Vásquez-Ponce, F., Higuera-Llantén, S., Pavlov, M. S., Ramírez-Orellana, R., Marshall, S. H., & Olivares-Pacheco, J. (2017). Alginate overproduction and biofilm formation by psychrotolerant *Pseudomonas mandelii* depend on temperature in Antarctic marine sediments. *Electronic Journal of Biotechnology*, 28, 27-34. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.05.001>

Whitney, J. C., Whitfield, G. B., Marmont, L. S., Yip, P., Neculai, A. M., Lobsanov, Y. D., Robinson, H., Ohman, D. E., & Howell, P. L. (2015). Dimeric c-di-GMP Is Required for Post-translational Regulation of Alginate Production in *Pseudomonas aeruginosa*\*. *Journal of Biological Chemistry*, 290(20), 12451-12462. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.645051>

Windhues, T., & Borchard, W. (2003). Effect of acetylation on physico-chemical properties of bacterial and algal alginates in physiological sodium chloride solutions investigated with light scattering techniques. *Carbohydrate Polymers*, 52(1), 47-52. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(02\)00265-5](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(02)00265-5)

Wolfram, F., Kitova, E. N., Robinson, H., Walvoort, M. T. C., Codée, J. D. C., Klassen, J. S., & Howell, P. L. (2014). Catalytic Mechanism and Mode of Action of the Periplasmic Alginate Epimerase AlgG \*. *Journal of Biological Chemistry*, 289(9), 6006-6019. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.533158>

Wróblewska-Krepsztul, J., Rydzkowski, T., Michalska-Požoga, I., & Thakur, V. K. (2019). Biopolymers for Biomedical and Pharmaceutical Applications: Recent Advances and Overview of Alginate Electrospinning. *Nanomaterials*, 9(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/nano9030404>

Wu, G., Cruz-Ramos, H., Hill, S., Green, J., Sawers, G., & Poole, R. K. (2000). Regulation of Cytochrome bd Expression in the Obligate Aerobe *Azotobacter vinelandii* by CydR (Fnr). *Journal of Biological Chemistry*, 275(7), 4679-4686. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.7.4679>

Wu, Z., Xie, S., Kang, Y., Shan, X., Li, Q., & Cai, Z. (2021). Biocompatibility evaluation of a 3D-bioprinted alginate-GelMA-bacteria nanocellulose (BNC) scaffold laden with oriented-growth RSC96 cells. *Materials Science and Engineering: C*, 129, 112393. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112393>

Xing, M., Cao, Q., Wang, Y., Xiao, H., Zhao, J., Zhang, Q., Ji, A., & Song, S. (2020). Advances in Research on the Bioactivity of Alginate Oligosaccharides. *Marine Drugs*, 18(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/md18030144>

Xue, Z., Sun, X.-M., Chen, C., Zhang, X.-Y., Chen, X.-L., Zhang, Y.-Z., Fan, S.-J., & Xu, F. (2022). A Novel Alginate Lyase: Identification, Characterization, and Potential Application in Alginate Trisaccharide Preparation. *Marine Drugs*, 20(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/md20030159>

Yin, Y., Withers, T. R., Wang, X., & Yu, H. D. (2013). Evidence for Sigma Factor Competition in the Regulation of Alginate Production by *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS ONE*, 8(8), e72329. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072329>

Zhan, C., Hagrot, E., Brandt, L., & Chotteau, V. (2019). Study of hydrodynamics in wave bioreactors by computational fluid dynamics reveals a resonance phenomenon. *Chemical Engineering Science*, 193, 53-65. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2018.08.017>

Zhang, L., Li, X., Zhang, X., Li, Y., & Wang, L. (2021). Bacterial alginate metabolism: An important pathway for bioconversion of brown algae. *Biotechnology for Biofuels*, 14(1), 158. <https://doi.org/10.1186/s13068-021-02007-8>

Zhang, Y., Wei, W., Lv, P., Wang, L., & Ma, G. (2011). Preparation and evaluation of alginate–chitosan microspheres for oral delivery of insulin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 77(1), 11-19. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2010.09.016>

Zhu, Y., Bandopadhyay, P. C., & Wu, J. (2001). Measurement of Gas-Liquid Mass Transfer in an Agitated Vessel—A Comparison between Different Impellers. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, 34(5), 579-584. <https://doi.org/10.1252/jcej.34.579>

Zielinski, N. A., Maharaj, R., Roychoudhury, S., Danganan, C. E., Hendrickson, W., & Chakrabarty, A. M. (1992). Alginate synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: Environmental regulation of the algC promoter. *Journal of Bacteriology*, 174(23), 7680-7688. <https://doi.org/10.1128/jb.174.23.7680-7688.1992>

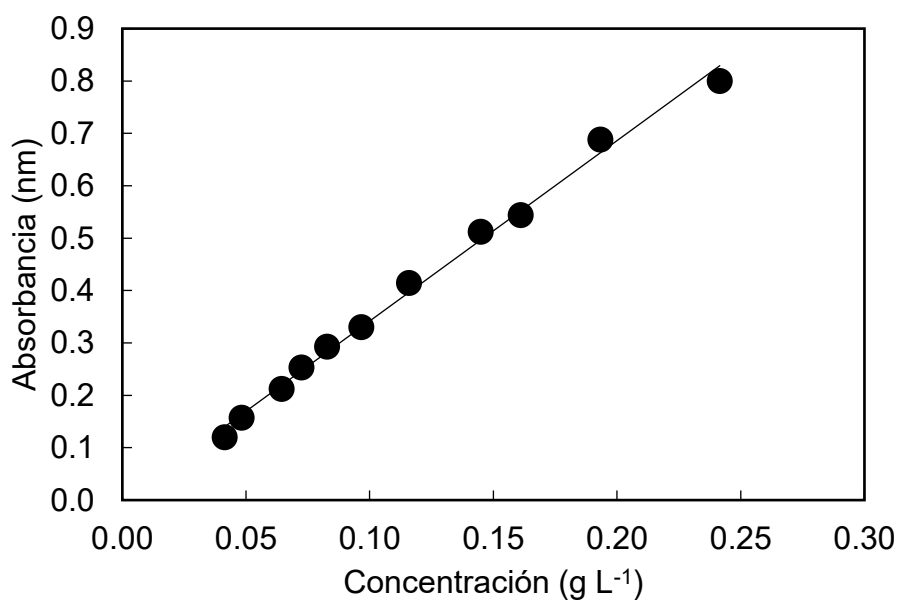
## ANEXOS

### Anexo 1: Curva de calibrado para la determinación de biomasa

A continuación, se presenta la Figura A.1 y Ecuación A.1, correspondiente a la curva de calibración utilizada para estimar la biomasa de *A. vinelandii* ATCC 9046 a partir de la medida de absorbancia a 600 nm (OD<sub>600</sub>):

$$\text{Biomasa (g L}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Absorbancia} - 0,0025}{3,444} \quad \text{Ecuación A.1}$$

$$R^2 = 0,9945$$



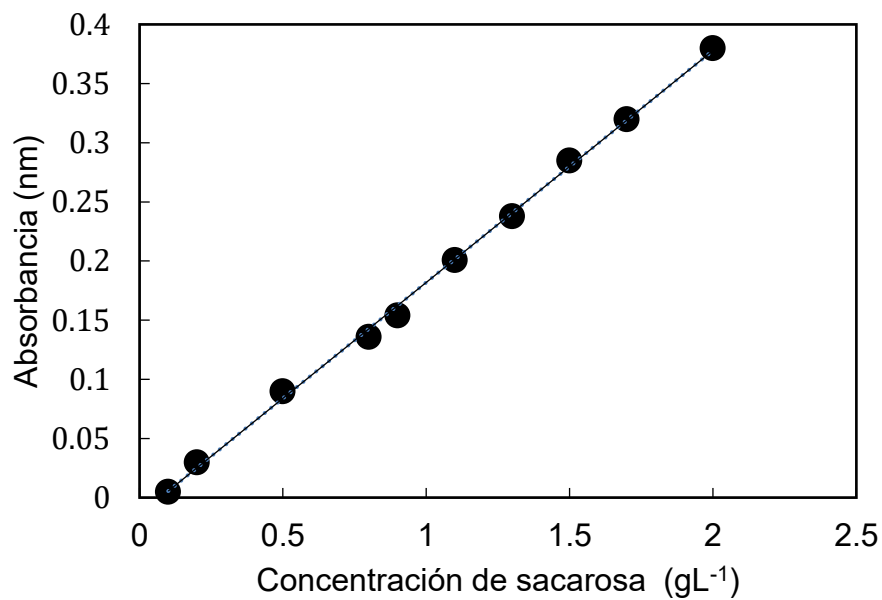
**Figura A. 1:** Curva de calibrado de la concentración de biomasa

## Anexo 2: Curva de calibrado para la determinación de sacarosa

A continuación, se presenta la Figura A.2 y Ecuación A.2, correspondiente a la curva de calibración utilizada para estimar la sacarosa a partir de la medida de absorbancia a 600 nm ( $OD_{600}$ ):

$$\text{Sacarosa (gL}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Absorbancia} - 0,0141}{0,196} \quad \text{Ecuación A.2}$$

$$R^2 = 0,9985$$

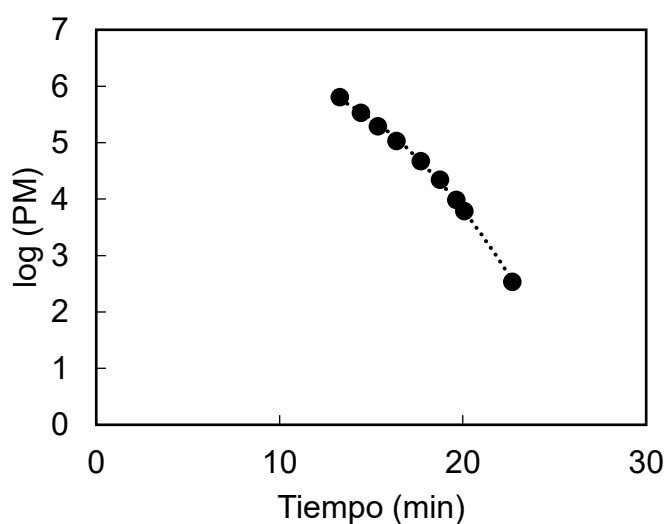


**Figura A. 2:** Curva de calibrado de la concentración de sacarosa.

### Anexo 3: Curva de calibrado para la determinación del peso molecular del alginato.

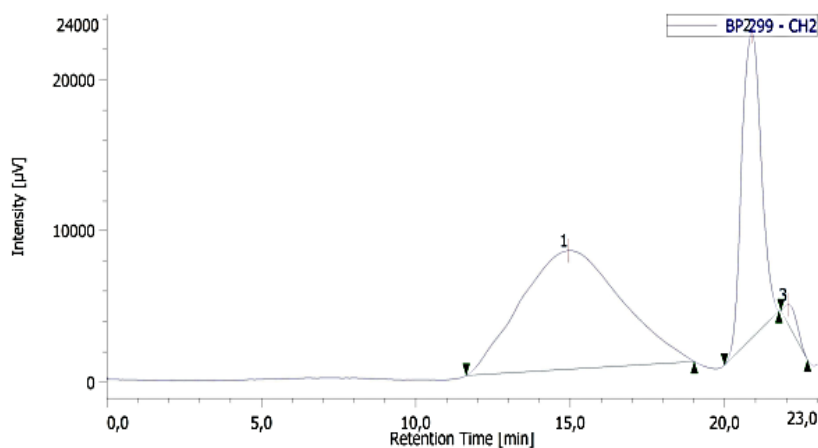
A continuación, se presenta la Figura A.3 y Ecuación A.3, correspondiente a la curva de calibración utilizada para estimar el peso molecular de alginato por GPC mediante HPLC.

$$\text{Logaritmo de PMP (kDa)} = -0,0185x^2 + 0,02346x + 4,7103 \quad \text{Ecuación A.3}$$
$$R^2 = 0,9988$$



**Figura A. 3:** Curva de calibrado para la determinación de peso molecular.

En la figura A.3.1 se presenta un ejemplo de cromatogramas obtenido para este análisis:

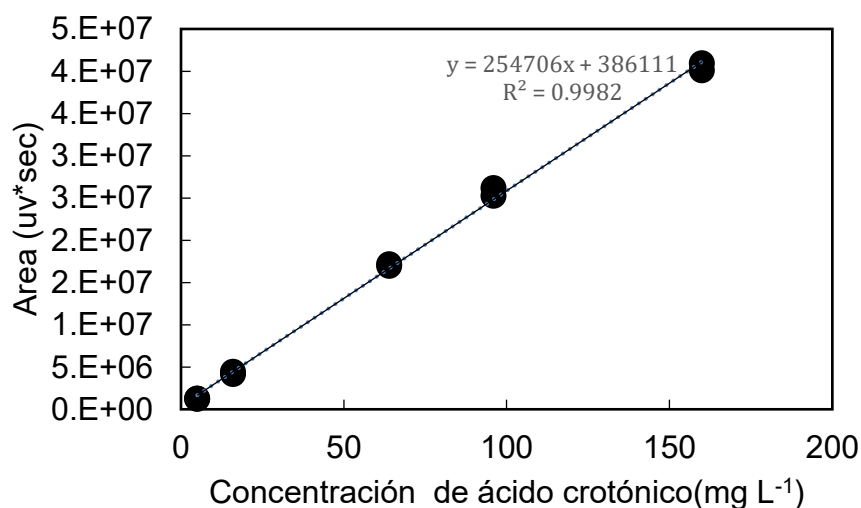


**Figura A. 3.1** Cromatograma obtenido para la determinación del peso molecular del alginato en sobrenadante obtenido en fase de crecimiento en un cultivo por lotes.

#### Anexo 4: Curva de calibrado para la concentración de ácido crotonico

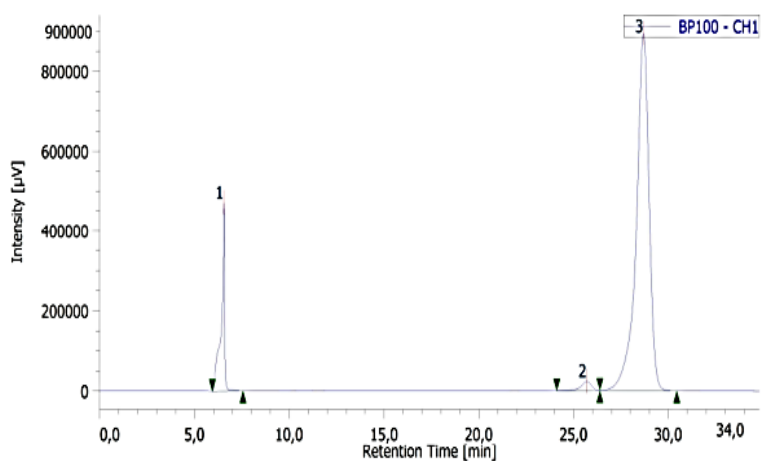
A continuación, se presenta la Figura A.4 y Ecuación A.4, correspondiente a la curva de calibración utilizada para estimar el ácido crotonico mediante HPLC.

$$\text{Acido crotonico (mgL}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Area (UV*sec)} - 386111}{254706} \quad \text{Ecuación A.4}$$



**Figura A. 4:** Curva de calibrado de la concentración de ácido crotonico

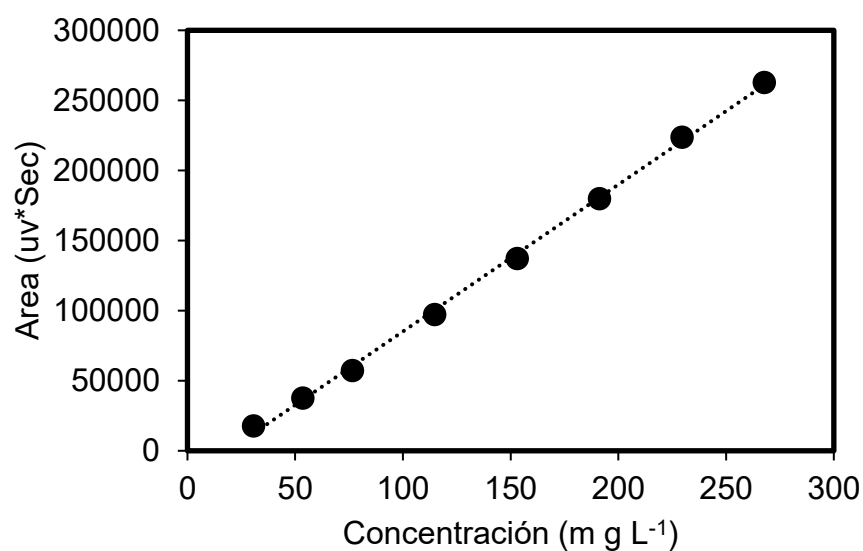
En la figura A.4.1. se presenta un ejemplo de cromatogramas obtenido para este análisis:



**Figura A.4.1.** Cromatograma obtenido para la determinación del grado acumulación del PHB en la biomasa en fase de crecimiento en un cultivo por lotes.

### Anexo 5: Curva de calibrado para la determinación del grado de acetilación

Como estándar se utilizaron soluciones de ácido acético de concentraciones entre 40 y 350 mg/L, las cuales se inyectaron en la columna de HPLC como se detalló en la metodología. Se obtuvieron las áreas de los *peaks* de acetato, con las cuales se construyó la curva de calibrado de la Figura A.5.



**Figura A.5.** Curva de calibrado de la concentración de ácido acético.

## Anexo 6: Determinación de la correlación empírica de $k_L a$

Se determinaron los valores de  $k_L a$  de forma experimental a las diferentes condiciones, obteniendo los coeficientes  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  de la correlación empírica.

En la tabla A.6.4. se muestran los valores obtenidos de  $\alpha$  cuando la velocidad de agitación (N) y la viscosidad aparente ( $\mu_a$ ) son constantes.

**Tabla A.6.4.** Valores de  $\alpha$  obtenidos de las regresiones a N y  $\mu_a$  constantes.

N (rps)	$\mu_a \cdot 10^3$ (Pa·s)	$V_s \cdot 10^3$ (m/s)	$\alpha$	R <sup>2</sup>
1,67	1,10	0,94 / 1,88 / 2,83	0,34 ± 0,06	0,9685
3,33	1,10	0,94 / 1,88 / 2,83	0,47 ± 0,05	0,9871
5,00	1,10	0,94 / 1,88 / 2,83	0,56 ± 0,02	0,9989
6,67	1,10	0,94 / 1,88 / 2,83	0,45 ± 0,02	0,9983
8,33	1,10	0,94 / 1,88 / 2,83	0,57 ± 0,03	0,9979
10,00	1,10	0,94 / 1,88 / 2,83	0,44 ± 0,04	0,9921
11,67	1,10	0,94 / 1,88 / 2,83	0,43 ± 0,03	0,9948
13,33	1,10	0,94 / 1,88 / 2,83	0,43 ± 0,02	0,9980
15,00	1,10	0,94 / 1,88 / 2,83	0,44 ± 0,05	0,9846
16,67	1,10	0,94 / 1,88 / 2,83	0,46 ± 0,05	0,9886
5,00	4,40	0,94 / 1,88 / 2,83	0,44 ± 0,13	0,8339
8,33	4,40	0,94 / 1,88 / 2,83	0,38 ± 0,04	0,9740
15,00	4,40	0,94 / 1,88 / 2,83	0,18 ± 0,08	0,6777
5,00	4,80	0,94 / 1,88 / 2,83	0,45 ± 0,07	0,9436
8,33	4,80	0,94 / 1,88 / 2,83	0,42 ± 0,04	0,9817
15,00	4,80	0,94 / 1,88 / 2,83	0,20 ± 0,10	0,6055
5,00	5,20	0,94 / 1,88 / 2,83	0,57 ± 0,12	0,9119
8,33	5,20	0,94 / 1,88 / 2,83	0,42 ± 0,05	0,9742
15,00	5,20	0,94 / 1,88 / 2,83	0,21 ± 0,05	0,8900
5,00	6,00	0,94 / 1,88 / 2,83	0,49 ± 0,07	0,9557
8,33	6,00	0,94 / 1,88 / 2,83	0,43 ± 0,06	0,9638
15,00	6,00	0,94 / 1,88 / 2,83	0,21 ± 0,08	0,7638
5,00	8,00	0,94 / 1,88 / 2,83	0,63 ± 0,07	0,9739
8,33	8,00	0,94 / 1,88 / 2,83	0,41 ± 0,06	0,9542
15,00	8,00	0,94 / 1,88 / 2,83	0,35 ± 0,06	0,9422

En la Tabla A.6.5. se muestran los valores obtenidos de  $\beta$  cuando la velocidad superficial ( $V_s$ ) y la viscosidad aparente ( $\mu_a$ ) son constantes.

**Tabla A.6.5.** Valores de  $\beta$  obtenidos de las regresiones a  $V_s$  y  $\mu_a$  constantes.

$V_s \cdot 10^3$ (m/s)	$\mu_a \cdot 10^3$ (Pa·s)	N (rps)	$\beta$	$R^2$
0,94	1,10	5,00 / 9,33 / 15	$1,21 \pm 0,05$	0,9887
1,88	1,10	5,00 / 9,33 / 15	$1,19 \pm 0,02$	0,9977
2,83	1,10	5,00 / 9,33 / 15	$1,23 \pm 0,02$	0,9973
0,94	4,40	5,00 / 9,33 / 15	$1,07 \pm 0,08$	0,9887
1,88	4,40	5,00 / 9,33 / 15	$0,73 \pm 0,13$	0,9400
2,83	4,40	5,00 / 9,33 / 15	$0,83 \pm 0,14$	0,9425
0,94	4,80	5,00 / 9,33 / 15	$1,05 \pm 0,05$	0,9952
1,88	4,80	5,00 / 9,33 / 15	$0,75 \pm 0,15$	0,9190
2,83	4,80	5,00 / 9,33 / 15	$0,82 \pm 0,14$	0,9452
0,94	5,20	5,00 / 9,33 / 15	$1,17 \pm 0,11$	0,9822
1,88	5,20	5,00 / 9,33 / 15	$0,81 \pm 0,13$	0,9513
2,83	5,20	5,00 / 9,33 / 15	$0,85 \pm 0,13$	0,9552
0,94	6,00	5,00 / 9,33 / 15	$1,11 \pm 0,05$	0,9955
1,88	6,00	5,00 / 9,33 / 15	$0,81 \pm 0,15$	0,9320
2,83	6,00	5,00 / 9,33 / 15	$0,84 \pm 0,12$	0,9590
0,94	8,00	5,00 / 9,33 / 15,00	$1,10 \pm 0,20$	0,9348
1,88	8,00	5,00 / 9,33 / 15,00	$0,82 \pm 0,19$	0,9002
2,83	8,00	5,00 / 9,33 / 15,00	$0,84 \pm 0,09$	0,9753

En la Tabla A.6.6. se muestran los valores obtenidos de  $\gamma$  cuando la velocidad de agitación (N) y la velocidad superficial ( $V_s$ ) son constantes.

**Tabla A.6.6.** Valores de  $\gamma$  obtenidos de las regresiones a N y  $V_s$  constantes.

N (rps)	$V_s \cdot 10^3$ (m/s)	$\mu_a \cdot 10^3$ (Pa·s)	$\gamma$	$R^2$
5,00	0,94	1,10 / 4,40 / 4,80 / 5,20 / 6,00 / 8,00	$-0,45 \pm 0,06$	0,9240
8,33	1,88	1,10 / 4,40 / 4,80 / 5,20 / 6,00 / 8,00	$-0,43 \pm 0,03$	0,9849
15,00	2,83	1,10 / 4,40 / 4,80 / 5,20 / 6,00 / 8,00	$-0,62 \pm 0,02$	0,9975
5,00	0,94	1,10 / 4,40 / 4,80 / 5,20 / 6,00 / 8,00	$-0,42 \pm 0,04$	0,9653
8,33	1,88	1,10 / 4,40 / 4,80 / 5,20 / 6,00 / 8,00	$-0,47 \pm 0,01$	0,9964
15,00	2,83	1,10 / 4,40 / 4,80 / 5,20 / 6,00 / 8,00	$-0,69 \pm 0,03$	0,9903
5,00	0,94	1,10 / 4,40 / 4,80 / 5,20 / 6,00 / 8,00	$-0,45 \pm 0,02$	0,9948
8,33	1,88	1,10 / 4,40 / 4,80 / 5,20 / 6,00 / 8,00	$-0,52 \pm 0,01$	0,9977
15,00	2,83	1,10 / 4,40 / 4,80 / 5,20 / 6,00 / 8,00	$-0,43 \pm 0,01$	0,9968

## PARTICIPACIÓN EN DIFUSION EN EVENTOS CIENTIFICOS

- Ponce, B., Santos, V.E., & Díaz-Barrera, A. Production of alginate hydrogels for biomedical applications **XVIII Simposio Latinoamericano de polímeros SLAP 2024** (December 02-06, 2024, (Puerto Varas, Chile).
- Ponce, B., Santos, V., & Díaz-Barrera, A. Alginate production and transcription levels of alginate lyases to different agitation rates in *Azotobacter vinelandii* cultures. **4° Bio Iberoamérica: iberoamerican Congress of Biotechnology** (September 03-06, 2024, (Monterrey, México).
- Ponce, B., Santos V., E., Díaz-Barrera, A. Evaluation of the respiration by changes in the agitation rates and its effect in alginate production. **European Congress of Biotechnology** (30 June-3 July 2024), (Netherlands).
- Ponce, B., Santos, V.E., & Díaz-Barrera A. Viscosifying power, molecular weight, and G / M Ratio of the alginate produced by *Azotobacter Vinelandii* at different agitation rates. **World Digital Congress of Chemical and Biochemical Engineering** (May 21-24, 2024).
- Ponce, B., Ladero, M., Santos, V.E., & Díaz-Barrera A. Changes in cellular morphology and alginate molecular weight produced by *Azotobacter vinelandii* under different agitation rates. **XVIII Congreso De La Sociedad Española de Biotecnología (BIOTEC 2023)** July 17-20, 2023, (Madrid, España).
- Porroche, A., Ponce B., Ladero, M., & Gallardo M.E. Novel alginate-derived matrices for cultivation and differentiation of iPSCs. **XVIII Congreso De La Sociedad Española de Biotecnología (BIOTEC 2023)** July 17-20, 2023, (Madrid, España).
- Zabaleta, M. R., Porroche, A., Ponce B., Gallardo M.E., & Ladero, M. Optimization of alginate production by *A. vinelandii* at flask scale. **XVIII Congreso De La Sociedad Española de Biotecnología (BIOTEC 2023)** July 17-20, 2023, (Madrid, España).

- Ponce, B., Santos, V., & Díaz-Barrera, A. Evaluation of the molecular weight of the alginate by changes in the agitation rate in *Azotobacter vinelandii* cultures. **WCCE11-11th World Congress of Chemical Engineering** June 4-8, 2023, (Buenos Aires, Argentina).
- Ponce, B., Santos, V., & Díaz-Barrera, A. Evaluation of the specific oxygen uptake rate by changes in the agitation rate in *Azotobacter vinelandii* cultures. **3° Bio Iberoamérica: iberoamerican Congress of Biotechnology** April 7-9, 2022, (Braga, Portugal).
- Ponce, B., Sánchez-Rosales, F., Andler, R., & Díaz-Barrera, A. Characterization of the molecular weight and the G / M ratio of the alginate produced by *Azotobacter vinelandii* under diazotrophic conditions at different oxygen transfer rates. **The 13th European Congress of Chemical Engineering (ECCE 13 & ECAB 6)**. September 20-23, 2021, online.

## ARTÍCULOS CIENTÍFICOS

### Capítulo de libro:

Ponce, B., Urtuvia, V., Castillo, T., Segura, D., Peña, C., & Díaz-Barrera A. (2023) Microbial Bioreactors at Different Scales for the Alginate Production by *Azotobacter vinelandii* <https://doi.org/10.1002/9781119874096.ch18>

### Artículos científicos

Ponce, B., Zamora-Quiroz, A., González, E., Andler, R., & Díaz-Barrera, A. (2025). Advances in alginate biosynthesis: regulation and production in *Azotobacter vinelandii*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 13, 1593893. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2025.1593893>

Urtuvia, V., Ponce, B., Andler, R., & Díaz-Barrera, A. (2023). Relation of 3HV fraction and thermomechanical properties of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) produced by *Azotobacter vinelandii* OP. *International Journal of Biological Macromolecules*, 253, 127681. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.127681>

González, E., Zuleta, C., Zamora, G., Maturana, N., Ponce, B., Rivero, M. V., ... & Díaz-Barrera, Á. (2023). Production of poly (3-hydroxybutyrate) and extracellular polymeric substances from glycerol by the acidophile *Acidiphilium cryptum*. *Extremophiles*, 27(3), 30. <https://doi.org/10.1007/s00792-023-01313-3>

Contreras-Abara, P., Castillo, T., Ponce, B., Urtuvia, V., Peña, C., & Díaz-Barrera, A. (2023). Continuous Bioproduction of Alginate Bacterial under Nitrogen Fixation and Nonfixation Conditions. *Fermentation*, 9(5), 426. <https://doi.org/10.3390/fermentation9050426>

Berrios, J., Theron, C. W., Steels, S., Ponce, B., Velastegui, E., Bustos, C., ... & Fickers, P. (2022). Role of dissimilative pathway of *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*): formaldehyde toxicity and energy metabolism. *Microorganisms*, 10(7), 1466. <https://doi.org/10.3390/microorganisms100714666>

Urtuvia, V., Ponce, B., Andler, R. & Díaz-Barrera, A. (2022). Extended batch cultures for poly(3- hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) production by *Azotobacter vinelandii* OP growing different aeration rates. *Biotech* 12, 304. <https://doi.org/10.1007/s13205-022-03380-3>

Ponce, B., Urtuvia, V., Maturana, N., Peña, C., & Díaz-Barrera, A. (2021). Increases in alginate production and transcription levels of alginate lyase (alyA1) by control of the oxygen transfer rate in *Azotobacter vinelandii* cultures under diazotrophic conditions. *Electronic Journal of Biotechnology*, 52, 35-44. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2021.04.007>

## PREMIOS

- **2022:** Ganador en el 9no puesto en la categoría de Ciencias, en el Concurso de Historias de la Ciencia Chilena 2022, Merck Millipore.
- **2024:** Premio a la mejor presentación oral en el XVIII Simposio Latinoamericano de polímeros (SLAP) (Puerto varas, Chile).

## ADJUDICACIÓN DE PROYECTOS

**2024 – 2025:** Director del proyecto **VIU - ANID N ° VIU24P0096:** Formulación de un prototipo de hidrogel de alginato de origen natural para uso en el área dental.