

## **“Estrategias de cultivo en la producción de alginatos por *Azotobacter vinelandii*”**

Angélica María Cuesta Alvarez, John Fredy Monsalve Gil, Mónica Mesa Correa,

Ana María Zapata Vélez, Mauricio Alberto Trujillo Roldán\*

e-mail: [matrujil@unalmed.edu.co](mailto:matrujil@unalmed.edu.co)

*Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, Facultad de Minas.*

*Cra. 80 Barrio Robledo, Medellín, Colombia.*

En este trabajo se estudio el efecto de diferentes fuentes componentes del medio de cultivo, en la producción y el peso molecular promedio, del alginato producido por *Azotobacter vinelandii*. Inicialmente se llevaron a cabo cultivos de *A. vinelandii* utilizando diferentes fuentes de carbono (fructuosa, galactosa, glucosa, lactosa y sacarosa). Además, se evaluó el suero de leche líquido y en polvo (hidrólisis ácida y enzimática) y jugo de caña como fuentes alternativas.

También se estudio el efecto de la relación carbono/nitrógeno, sobre el crecimiento de *A. vinelandii* y la producción de alginato. Para tal fin, se realizaron cultivos con y sin adición de la fuente de nitrógeno. Además, se determinó la mejor relación carbono/nitrógeno usando diferentes fuentes de nitrógeno orgánicas e inorgánicas.

Reportes previos han demostrado que algunos componentes del medio de cultivo provenientes de inóculos previos, afectan el crecimiento de *A. vinelandii* y la producción de alginato. Con la finalidad de entender como estos componentes del medio de cultivo afectan el crecimiento de *A. vinelandii* y la producción de alginatos, se realizaron de cultivos con intercambio de medio de cultivo.

El medio Burk-jugo de caña es la mejor fuente alternativa evaluada para la producción de alginato, superando en rendimiento y en concentración de alginato producido con sacarosa, reportada por otros autores como la fuente de carbono óptima. La mejor fuente de nitrógeno orgánica fue la peptona con una concentración de alginato de 4.8 g/l. La mejor fuente inorgánica fue el acetato de amonio con una concentración de alginato de 2.4 g/l. Los cultivos llevados a cabo con inóculos lavados mostraron que el medio de cultivo agotado no es el responsable de la culminación de la fase exponencial de crecimiento de *A. vinelandii* y que un alto crecimiento celular no implica una alta producción de alginato.

**Palabras claves:** alginatos, *Azotobacter vinelandii*, medio de cultivo

## “Estrategias de cultivo en la producción de alginatos por *Azotobacter vinelandii*”

Angélica María Cuesta Alvarez, John Fredy Monsalve Gil, Mónica Mesa Correa,

Ana María Zapata Vélez, Mauricio Alberto Trujillo Roldán\*

e-mail: [matrujil@unalmed.edu.co](mailto:matrujil@unalmed.edu.co)

Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, Facultad de Minas.

Cra. 80 Barrio Robledo, Medellín, Colombia.

**Palabras claves:** alginatos, *Azotobacter vinelandii*, medio de cultivo

### Introducción

Los alginatos son polisacáridos empleados como espesantes, gelificantes y estabilizantes en la industria textil, farmacéutica y alimentaria. Estos polímeros son extraídos de algas marinas, y también pueden ser obtenidos de fuentes bacterianas como *Azotobacter vinelandii* y *Pseudomonas aeruginosa*. La importancia de los alginatos radica en su capacidad para modificar las propiedades reológicas de los sistemas acuosos (1, 2). Las especies *Pseudomonas* y *Azotobacter* son las únicas fuentes procarionóticas que producen este polímero (1).

Un aspecto de gran importancia en la producción de polisacáridos microbianos, es la capacidad de influir sobre su composición y propiedades, mediante el control de las condiciones en el medio de cultivo. Además, de la posibilidad de obtener un material de composición química uniforme. La enorme diversidad de polímeros que son sintetizados por microorganismos permite plantear la posibilidad de encontrar un polisacárido con propiedades físicas de interés para cualquier aplicación industrial (2). La obtención de alginatos por fermentación es una opción técnicamente factible y económicamente atractiva (3). En este contexto, *Azotobacter vinelandii* constituye una buena opción para la obtención de este producto, por producir un alginato de características similares al obtenido de algas (1, 3, 4).

El objetivo de este proyecto fue estudiar el efecto de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno, en la producción, peso molecular promedio, índice de polidispersión del alginato, viscosidad del medio de cultivo, crecimiento de *A. vinelandii* y consumo de las fuentes. Para tal fin, se llevaron a cabo cultivos utilizando diferentes fuentes de carbono en medio Burk modificado como: fructuosa, galactosa, glucosa, lactosa y sacarosa. Además, se evaluó el suero de leche líquido y en polvo (hidrólisis ácida y enzimática) y el jugo de caña como fuentes alternativas. También, se evaluaron diferentes fuentes de nitrógeno, en estos cultivos, se mantuvo fija la relación carbono / nitrógeno. Para determinar la mejor relación másica carbono / nitrógeno se usaron diferentes proporciones de dichos componentes en el medio

de cultivo, y se utilizó la mejor fuente orgánica e inorgánica de nitrógeno. El crecimiento bacteriano y la producción de alginatos fueron evaluados al final de los cultivos (4, 5).

Con el objeto de entender como los componentes del medio de cultivo provenientes de inóculos previos, afectan el crecimiento de *A. vinelandii* y la producción de alginatos, se realizaron cultivos con dos estrategias metodológicas. La primera consistió, en realizar cultivos con lavado del inóculo (con el fin de inocular células lavadas), únicamente en la hora cero, sacrificando un matraz cada 12 horas. En la segunda estrategia, los matraces fueron inoculados con células lavadas y la biomasa se resuspendió en el medio nuevo con el fin de determinar la producción de alginato después de cada resiembra (6).

### Metodología

#### *Microorganismo, medio de cultivo y condiciones de crecimiento*

La cepa de *Azotobacter vinelandii* ATCC 9046 se preservó a 4°C en tubos inclinados con medio Burk modificado solidificado con agar (18 g/l) (ver composición adelante), sin extracto de levadura. El mantenimiento se realizó con resiembras mensuales como ha sido descrito previamente (4–8). El microorganismo se creció en medio Burk modificado (MBM) con la siguiente composición (en g/l): sacarosa (20); extracto de levadura (3); K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0.66); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.16); MOPS (1.42); CaSO<sub>4</sub> (0.05); NaCl (0.2); MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0.2); NaMoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (0.0029); FeSO<sub>4</sub> (0.027). Las sales de potasio, el sulfato de calcio, la sacarosa, el extracto de levadura y el MOPS se disolvieron en agua destilada y el pH se ajustó a 7.2 con NaOH. Con el objeto de evitar precipitaciones, las tres fracciones se esterilizaron por separado a 121°C durante 20 min y ya estériles se mezclaron en campana de flujo laminar (4-8).

Para la obtención de los inóculos, se sembró de los tubos inclinados a cajas Petri conteniendo aproximadamente 20 ml de medio sólido Burk modificado. Posteriormente, se incubaron (por duplicado) a 29°C durante 72 horas. Tres asadas de las células de las cajas fueron usadas para inocular los matraces (preinóculos), los cuales se

incubaron durante 24 horas a una velocidad de agitación de 200 rpm y una temperatura de 29°C. Los cultivos en matraces se llevaron a cabo usando Erlenmeyer de 250 ml, con un volumen de trabajo de 50 ml de medio de cultivo. En condiciones estériles, 5 ml de inóculo fueron adicionados a 45 ml de MBM en cada matraz. Los matraces se incubaron durante 120 horas, con una velocidad de agitación de 280 rpm y 29°C (agitadora Gufa instruments). Cada doce horas se extrajeron de la incubadora dos matraces para realizar los análisis correspondientes (4-6).

Se realizó una cinética de crecimiento en medio Burk modificado de sacarosa y una para cada medio no convencional suero de leche desproteinizado e hidrolizado (hidrólisis ácida y enzimática) y jugo de caña. Para las demás fuentes de carbono se realizaron pruebas de crecimiento a 131 horas por triplicado. Para los cultivos crecidos con fuentes de nitrógeno diferentes al extracto de levadura, las células fueron lavadas antes de ser inoculadas en los matraces. Los pre-inóculos se obtuvieron con el procedimiento anteriormente descrito. En los cultivos con resiembra y recambio de inóculo se sacrificaron matraces cada 12 horas para posteriores análisis (4-6).

#### *Determinación de la biomasa y alginato*

La determinación de biomasa se llevó a cabo por un método gravimétrico de peso seco (en g/l) según lo reportado previamente (6,8,10) y modificado según necesidades. Para el alginato se realizó la técnica basada en la precipitación con isopropanol y cuantificación gravimétrica del mismo (9, 10, 6).

#### *Determinación de la viscosidad*

La viscosidad de los medios de cultivo fue medida en un viscosímetro de cono y plato (Wells-Brookfield, U.S.A) (6) a una velocidad de rotación de 6 rpm, la cual corresponde a una velocidad de deformación de  $12 \text{ s}^{-1}$  a temperatura ambiente.

#### *Determinación del peso molecular promedio de los alginatos*

Los pesos moleculares se determinaron por cromatografía de filtración en gel (CFG) usando un par de columnas de Ultrahidrogel (UG 500 Waters y lineal Waters) de 7.8 mm (diámetro interno) por 300 mm, acopladas a un equipo de HPLC (Waters 625) con un detector de índice de refracción (Waters, 410). Como fase móvil se usó  $\text{NaNO}_3$  0.1M a 35°C a un flujo de 0.9 ml/min. La calibración de las columnas se llevó a cabo con un método estándar de calibración utilizando pululanos *Aureobsidium pullulans* de como

estándares de peso molecular con un intervalo de 5,800 a 1,600,000 Daltones (6)

#### *Hidrólisis ácida y enzimática del suero de leche de suero de leche*

La hidrólisis ácida se llevó a cabo ajustando el pH del suero a 5.5 (pH isoelectrico) y se realizó un calentamiento del mismo a 90°C por 20 minutos, luego se removió la proteína por centrifugación entre 2,000 x g y 5,000 x g. Se ajustó el pH a 1.5 con HCl concentrado y se llevó a 121°C por 30 minutos. (Roukas 1999). Las condiciones para la hidrólisis enzimática estuvieron basadas en el trabajo realizado por López y Zuluaga (15) y la enzima es Maxilact L2000, 2000 NLU/g siendo un NLU la masa de enzima comercial que produce un  $\mu\text{mol}$  de ONP [o-nitrofenol] desde una solución ONPG [o-nitrofenol  $\beta$ -D-galactopiranoside], bajo condiciones estándar. Enzima facilitada por InterEnzimas S.A. (Colombia)

Para lograr un grado de hidrólisis de un 80 %: pH: 6.6, temperatura 37°C, solución agitada todo el tiempo, tiempo: 5.52 horas y concentración de enzima: 2392 NLU/l. La cantidad de enzima adicionada fue 0.598 g.

#### *Determinación de azúcares reductores totales*

El método se basa en la hidrólisis ácida de la sacarosa para la posterior medición de azúcares reductores libres por medio de la reacción del ácido dinitrosalicílico (DNS) (6-10, 16).

## **Resultados y discusión**

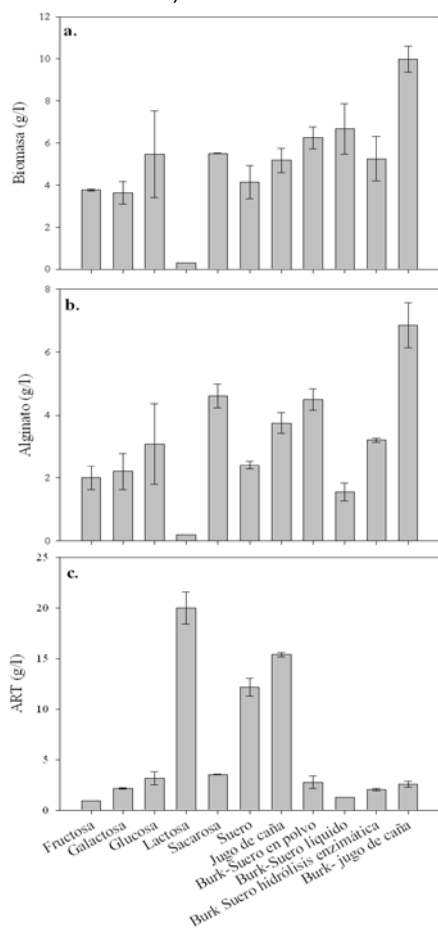
#### *Evaluación de fuentes de carbono*

En la figura 1 se presentan las fuentes de carbono evaluadas, el crecimiento de biomasa, la producción de alginato y la concentración de azúcares reductores. La fuente que presentó la mayor producción de biomasa y alginato fue la glucosa con 5.47 g/l de biomasa y 3.08 g/l alginato, seguida de la galactosa (3.63 g/l y 2.20 g/l) y la fructosa (3.77 g/l y 2.0 g/l). Estos resultados confirman en hecho de que *A. vinelandii* puede utilizar cualquiera de estos tres monómeros para producir alginato de acuerdo a lo reportado previamente por Pindar y Bucke (17) y Wong (18)

*A. vinelandii* no presentó crecimiento y producción de alginato en cultivos llevados en medio de cultivo Burk-lactosa (figura 1). Esto es debido a que *A. vinelandii* no posee  $\beta$ -galactosidasa. Además, Wong *et al.* (1995) reportó que la bacteria presenta actividad  $\alpha$ -galactosidasa. Estos resultados confirmaron la necesidad de hidrolizar (en forma ácida o enzimática) la lactosa

presente en el medio de cultivo, adicionado como suero de leche.

Figura 1. Cultivos a tiempo final (131 horas) para diferentes fuentes de carbono llevados a cabo en matraces convencionales. Crecimiento de *A. vinelandii* (a), producción de alginato (b) y Azúcares reductores totales ART (c). El suero (en todos los casos fue previamente hidrolizado en forma ácida, a excepción de la hidrólisis enzimática)

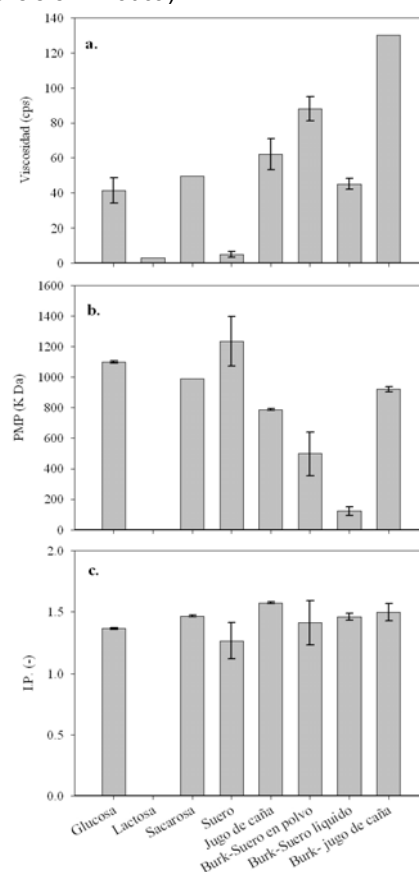


En la figura 1 se observa que entre las fuentes de carbono no convencionales (jugo de caña y suero de leche), la mayor concentración final de biomasa (9.98 g/l) y de alginato (6.85 g/l) se obtuvo en medio de cultivo Burk- jugo de caña. El siguiente medio que presentó mayor producción de biomasa fue el medio de cultivo Burk-suero líquido con 6.68 g/l, sin embargo, la concentración de alginato llegó a ser de 1.54 g/l. El medio Burk-suero en polvo presentó una producción de 6.25 g/l de biomasa y 4.50 g/l de alginato, esta fue el segundo medio de cultivo con mayor producción de alginato. Es necesario remarcar que, para los medios de cultivo alternativos, conteniendo sólidos, los métodos de análisis realizados para biomasa y alginato, están siendo afectados por sólidos precipitados por centrifugación, en el caso de la biomasa, y por precipitación con isopropanol, en el caso del alginato. Para el jugo de caña diluido a 20 g/l, se cuantificó  $3.30 \pm 0.87$

g/l de material precipitable por centrifugación. No se realizó una corrección a los resultados de biomasa, puesto que es posible que estos sólidos suspendidos pueden estar siendo utilizados por el microorganismo para su crecimiento.

Con medio Burk-jugo de caña se obtuvo un medio con una viscosidad de 130 cps a pesar de no tener un peso molecular alto en comparación con las otras fuentes de carbono (figura 2). Se observa además, que el medio jugo de caña es más viscoso que el medio Burk-sacarosa a pesar de poseer un menor peso molecular promedio y una menor concentración de alginato (figura 1.b), esto indica que no necesariamente a mayor concentración de alginato y a mayor peso molecular se obtiene mayor viscosidad del medio de cultivo.

Figura 2. Cultivos a tiempo final (131 horas) para diferentes fuentes de carbono llevados a cabo en matraces convencionales. Viscosidad del caldo (a), peso molecular promedio (PMP) (b) e índice de polidispersión (c). El suero (en todos los casos fue previamente hidrolizado en forma ácida, a excepción de la hidrólisis enzimática).



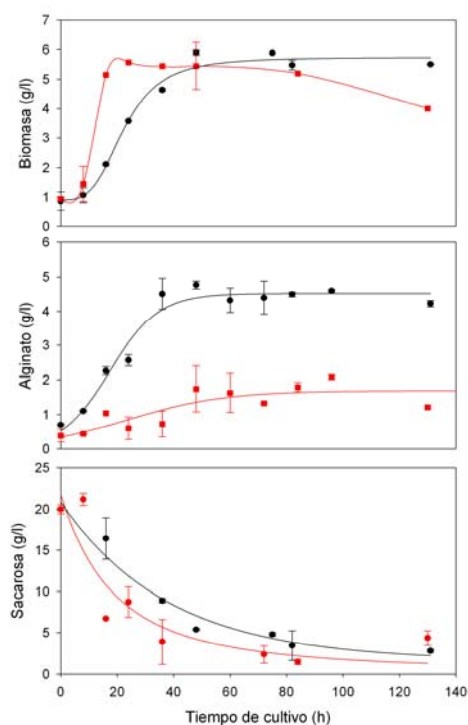
El medio de cultivo de suero hidrolizado presentó el mayor peso molecular promedio (1232 kDa) de todas las fuentes de carbono con el menor índice de polidispersión (I.P.) lo que indicó que se obtuvo un polímero homogéneo (figura 2.c). Sin

embargo, con este medio de cultivo solamente se obtuvo una viscosidad del caldo de 4.96 cps (figura 2 a). Esta baja viscosidad puede ser explicada por la baja concentración de alginato obtenida al final del cultivo (2.4 g/l).

### Evaluación de fuentes de nitrógeno

Como se puede observar en la figura 3, en la evaluación bajo condiciones de fijación de nitrógeno, *A. vinelandii* enfoca su metabolismo en el crecimiento celular, por lo que la producción del polímero se ve notablemente reducida con una concentración máxima de 1.7g/l. La concentración máxima obtenida en el medio enriquecido con extracto de levadura como fuente de nitrógeno fue de 4.7 g/l. Bajo esta última condición de cultivo, se observó que la producción del polímero se encuentra asociada al crecimiento de la bacteria. Mientras que, bajo condiciones diazotróficas, la síntesis de alginato estuvo parcialmente asociada al crecimiento, observándose también la síntesis en la fase estacionaria (figura 3).

Figura 3. Cinéticas de crecimiento (a), producción de alginato (b) y consumo de sacarosa (c) para cultivos de *A. vinelandii* ATCC9046 con adición de nitrógeno (●) y sin adición de nitrógeno (■), en cultivos crecidos en matraces a 200 rpm y 29°C.

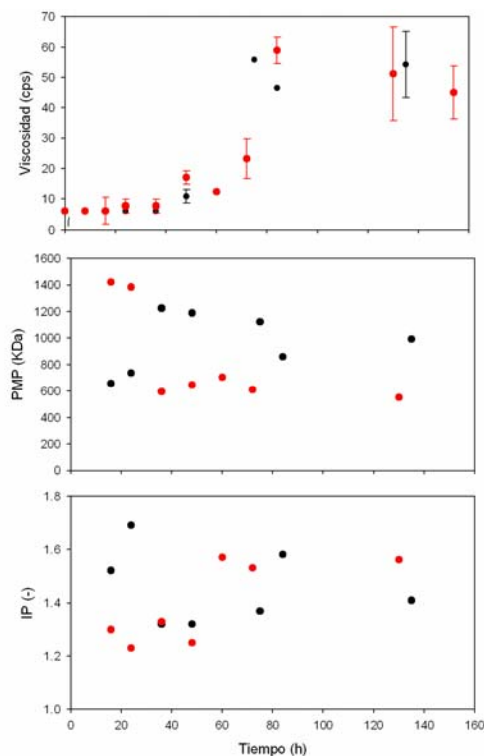


El rendimiento y la productividad de alginato basados en la biomasa son mayores para el cultivo adicionado con una fuente de nitrógeno, con un rendimiento global de  $0.81 \text{ g}_{\text{alg}}/\text{g}_{\text{biom}}$  y una productividad de  $0.017 \text{ g}_{\text{alg}}/\text{g}_{\text{biom}} \text{ h}$ . Como era de

esperarse, el rendimiento y la productividad de los cultivos diazotróficos fue menor, con valores de  $0.31 \text{ g}_{\text{alg}}/\text{g}_{\text{biom}}$  y  $0.006 \text{ g}_{\text{alg}}/\text{g}_{\text{biom}} \text{ h}$ , respectivamente.

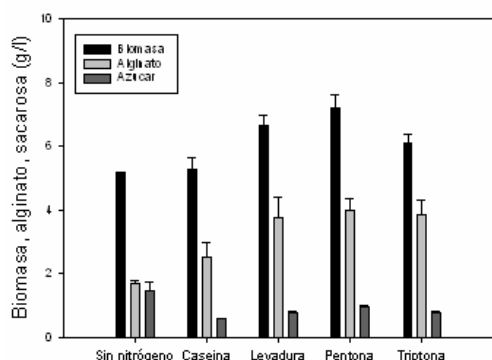
En los cultivos llevados a cabo con extracto de levadura como fuente de nitrógeno, el I.P. disminuye (figura 4.c) cuando el PMP aumenta (figura 4.b) como consecuencia de la polimerización del alginato, a su vez el I.P. aumenta cuando hay depolimerización, causada por la actividad alginato-liasa (12). Por otra parte, los cultivos diazotróficos presentan un aumento del I.P. debido a la continua depolimerización del alginato.

Figura 4. Cinéticas de viscosidad (a), Peso Molecular Promedio (b) e índice de polidispersión(c) para cultivos de *A. vinelandii* ATCC-9046 con adición de nitrógeno (●) y sin adición de nitrógeno (■), en cultivos crecidos en matraces a 200 rpm y 29°C.



Las concentraciones de biomasa al final del cultivo (120h), indican que el mayor crecimiento bacteriano se presenta al usar peptona como fuente nitrogenada en el medio de cultivo, con una concentración de 7.2 g/l. Las concentraciones obtenidas para la caseína, extracto de levadura y triptona fueron 5.28 g/l, 6.66 g/l y 6.08 g/l respectivamente. Comparando estos resultados con los cultivos crecidos bajo condiciones de fijación de nitrógeno (figura 5), se encuentra que con la adición de una fuente nitrogenada orgánica al medio de cultivo, se obtienen mayores concentraciones de biomasa.

Figura 5. Crecimiento y producción de alginato de *A. vinelandii* ATCC-9046, en cultivos crecidos en medio Burk y enriquecidos con diferentes fuentes orgánicas de nitrógeno.



Los cultivos llevados a cabo con las fuentes orgánicas de nitrógeno permiten obtener mayores concentraciones finales de alginato y biomasa, comparado con las fuentes inorgánicas evaluadas en este trabajo. Estos datos permiten proponer, que existen otros componentes de las fuentes orgánicas de nitrógeno que pueden estar influyendo en forma positiva las cinéticas de crecimiento bacteriano y producción de alginatos.

La máxima viscosidad alcanzada en el medio (91 cps), se obtuvo en los cultivos que contenían extracto de levadura como fuente de nitrógeno. Sin embargo, el mayor peso molecular promedio se presentó para el cultivo con peptona, con un valor de 1524.5 KDa, para este cultivo la viscosidad en el medio fue de 78 cps. Estos valores fueron alcanzados pasadas 120 horas de cultivo, ya que solo fueron evaluados los puntos finales de la fermentación.

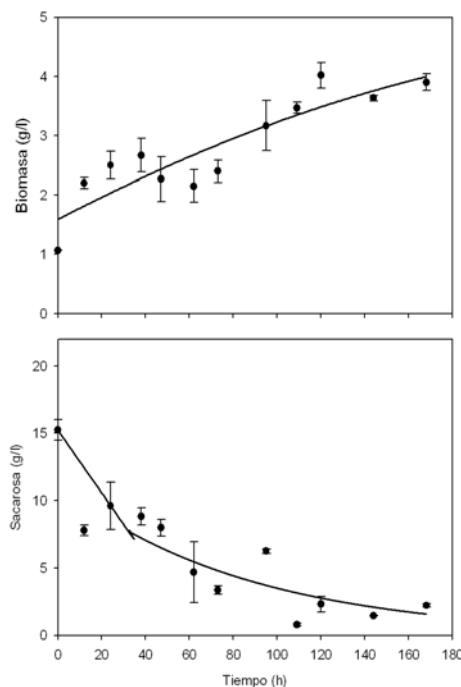
#### Estrategias de cultivo

La figura 6 muestra el crecimiento de *A. vinelandii* silvestre y el consumo de fuente de carbono en los cultivos llevados a cabo con células lavadas. En esta cinética, se obtiene 4.02 g/l de biomasa a las 120 h. Sin embargo, los datos muestran que después de este tiempo se alcanza una etapa estacionaria.

En el consumo de fuente de carbono se observa un descenso rápido en las primeras horas de cultivo y luego constante hasta el consumo casi total de la sacarosa (figura 6.b). Para esta cinética la concentración final de alginato alcanza 4.2 g/l de alginato. Los resultados aquí reportados están de acuerdo a resultados previos reportados por Trujillo-Roldán et al. (13), quien alcanzó valores de concentración de biomasa máxima, similares a los de este trabajo en cultivos llevados a cabo en fermentador (usando células lavadas) con la cepa silvestre. Sin embargo, en este trabajo se

alcanzaron concentraciones finales de alginato, mayores a las reportadas previamente (13).

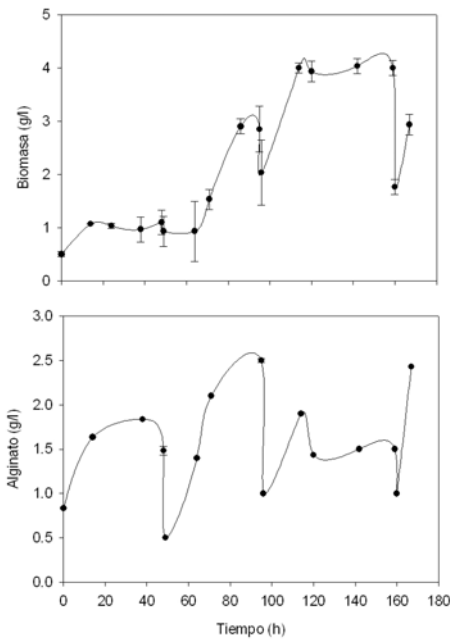
Figura 6. Cinética de crecimiento de *A. vinelandii* ATCC 9046 con lavados solo al inicio **a.** Biomasa (g/l) **b.** Sacarosa (g/l). Cultivos llevados a cabo a 200 rpm y 29°C.



La cinética que se presenta en la figura 7 fue llevada a cabo con la cepa silvestre, en ella se realizaron lavados en las horas 48, 96 y 160 de cultivo, de esta manera se pueden destacar 3 recrecimientos consecutivos. Se observa que la biomasa aumenta 0.5 g/l en las primeras 12 horas y se detiene hasta las 71 h. Posteriormente, comienza un crecimiento rápido alcanzando 2.9 g/l. Después del segundo lavado, el crecimiento es alto, llegando a un valor de 4.0 g/l a las 114 h. Se puede observar que la pérdida de células es mayor en cada lavado consecutivo, causado por la alta viscosidad alcanzada en cada caso.

La producción de alginato se comporta de manera similar. Se aprecian caídas luego de los lavados, sin embargo, no se logra retirar todo el alginato al centrifugar los cultivos y los aumentos de concentración de alginato son análogos al comportamiento de la biomasa. Las concentraciones alcanzadas siguen siendo bajas, con 2.5 g/l como valor máximo de producción, lo que significa un 58% menos alginato que para cultivos convencionales con *A. vinelandii* silvestre 6 g/l (9).

Figura 7. Cinética de crecimiento de *A. vinelandii* ATCC 9046 con lavado al inicio y recambios consecutivos de medio en las horas 48, 95 y 159. **a.** Biomasa (g/l). **b.** Alginato Cultivos llevados a cabo a 200 rpm y 29°C



## Conclusiones

El medio Burk-jugo de caña es la mejor fuente alternativa evaluada para la producción de alginato con *A. vinelandii*, superando en rendimiento y en concentración de alginato a la fuente de carbono utilizada tradicionalmente (sacarosa). Además de ser una fuente potencial para la producción de biomasa. Los cultivos llevados a cabo con medio Burk-suero en polvo (hidrólisis ácida), presentaron la mayor concentración final de alginato, comparado con los cultivos llevados a cabo con los otros sueros evaluados. Los cultivos llevados a cabo con el medio suero de leche líquido obtuvo el alginato con mayor peso molecular promedio y con menor índice de polidispersión. La hidrólisis ácida del suero de leche proporciona más altas concentraciones finales de alginato y biomasa que la hidrólisis enzimática.

En forma diazotrófica *A. vinelandii* enfoca su metabolismo en el crecimiento celular evidenciando una velocidad específica de crecimiento 1.7 veces mayor que la presentada en presencia de nitrógeno. Estos resultados proponen que existe una capacidad respiratoria mayor en los cultivos llevados a cabo sin nitrógeno exógeno en el medio.

La mejor fuente orgánica fue la peptona con una concentración de alginato de 4.8 g/l. La mejor fuente inorgánica fue el acetato de amonio con una concentración de alginato de 2.4 g/l.

Esta es la primera vez que se lleva a cabo una comparación de fuentes orgánicas e inorgánicas de nitrógeno, teniendo en cuenta la misma relación másica de carbono y nitrógeno. Esta

comparación, permitió determinar que las fuentes orgánicas favorecen la producción del polímero con respecto a las fuentes inorgánicas y al medio no nitrogenado.

En los cultivos llevados a cabo con inóculos lavados, se obtuvo una concentración de alginato final similar a otros cultivos convencionales reportados previamente, en cuanto a la concentración de biomasa se encontró que la bacteria no recrece significativamente, alcanzando concentraciones finales similares a las reportadas en cultivos convencionales en lote y en continuo.

Usando cultivos inoculados con células lavadas y realizando recambios de medio consecutivos, no se logró un aumento en la producción de alginatos por *A. vinelandii*. Al calcular la cantidad total de alginato producido en los cultivos lavados al inicio y con recambios de medio de cultivo posteriores, se obtuvieron concentraciones finales de alginato similares a las reportadas. Esto indica que los componentes del medio de cultivo agotado (alginato y posiblemente otros desconocidos) juegan papeles muy importantes en la determinación de la concentración final de alginato producido.

## Bibliografía

- (1) Rehm BH, Valla S (1997) Bacterial alginates. Biosynthesis and application. *Appl Microbiol Biotechnol* 48: 281 – 288
- (2) López-Munguía A., Brito E., Galindo E. (1993) Biopolímeros. En: *Biología Alimentaria*. García-Garibay, Quintero-Ramírez y López-Munguía (Coordinadores), Ed. Limusa, Capítulo 13, pp. 423-451,
- (3) Anison G, Couperwhite L (1986) Effect of limiting substrate concentration, growth rate and aeration on alginate composition and production by *Azotobacter vinelandii* in continuous culture. *Food Hydrocolloids* 1:101-111
- (4) Cuesta A, Monsalve J.(2005) Evaluación de medios alternativos para la producción de alginato por *A. vinelandii*. Trabajo Dirigido de Grado. Universidad Nacional de Colombia. Sede Medellín.
- (5) Zapata A. (2005) Efecto de la relación carbono / nitrógeno en la producción de alginatos por *Azotobacter vinelandii*. Trabajo Dirigido de Grado. Universidad Nacional de Colombia. Sede Medellín.Colombia. Colombia
- (6) Mesa C. 2005 Estrategia de cultivo para aumentar la producción de alginatos por *Azotobacter vinelandii* SML2. Trabajo Dirigido de Grado. Universidad Nacional de Colombia. Sede Medellín.Colombia
- (7) Peña C, Campos N, Galindo E (1997) Changes in alginate molecular mass distributions, broth viscosity and morphology of *Azotobacter vinelandii* culture in shake flask. *Appl Microbiol Biotechnol* 48: 510 – 515

- (8) Peña C (1998) Producción de alginatos bacterianos por fermentación líquida: estudio de los factores determinantes en la biosíntesis y composición del alginato producido por *Azotobacter vinelandii*. Tesis de Doctorado. Instituto de Biotecnología. UNAM. 108p
- (9) Peña C, Trujillo-Roldán MA, Galindo E (2000) Influence of dissolved oxygen tension on the polymer molecular weight produced by *Azotobacter vinelandii*. *Enzyme Microb Technol* 27: 390 – 398
- (10) Jarman TR, Deavin L, Slocombe S, Righelato RC (1978) Investigation of the effect of environmental conditions on the rate of exopolysaccharides synthesis in *Azotobacter vinelandii*. *J Gen Microbiol* 107: 59 – 64
- (11) Trujillo-Roldán MA (1999) Efecto de las oscilaciones en el oxígeno disuelto sobre la producción de alginatos por *Azotobacter vinelandii*. Tesis de Maestría. Instituto de Biotecnología. UNAM, 83p
- (12) Trujillo-Roldán MA, Peña C, Ramírez OT, Galindo E (2001) Effect of oscillating dissolved oxygen tension on the production of alginate by *Azotobacter vinelandii*. *Biotechnol Prog* 17: 1042-1048
- (13) Trujillo-Roldán MA, Moreno S, Segura D, Galindo E, Espín G (2003a) Alginate production by an *Azotobacter vinelandii* mutant unable to produce alginate lyase. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 60: 733-737
- (14) Trujillo-Roldán MA, Peña C, Galindo E (2003b) Components in the inoculum determine the kinetics of *Azotobacter vinelandii* cultures and the molecular weight of its alginate. *Biotechnology Letters* 25: 1251-1254
- (15) López C y Zuluaga A (2004) Producción de ácido láctico a partir de suero de leche. Trabajo Dirigido de Grado. Universidad Nacional de Colombia. Sede Medellín. Colombia
- (16) Miller G (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reductin sugar. *Anal Chem* 31 (3): 426- 428
- (17) Pindar DF, Bucke C (1975) The biosynthesis of alginic acid by *Azotobacter vinelandii*. *Biochem J* 152 (3): 617-622
- (18) Wong TY, Preston LA, Schiller NL (2000) Alginate lyase: A review of major sources and enzyme characteristics, structure-function analysis, biological roles, and applications. *Ann Rev Microbiol* 54:289-340

### Agradecimientos

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biotecnología y Electroquímica de la Universidad Nacional de Colombia. Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo económico de la Dirección Nacional de Investigación (DINAIN) a través del Proyecto 20601002528: “Estudio de los componentes del medio de cultivo que afectan la producción de alginatos por *Azotobacter vinelandii*” y del Programa de Cooperación Científica Internacional de Intercambio de Investigadores Colombia-México, COLCIENCIAS y CONACyT. Los autores agradecen el apoyo del Dr. Enrique Galindo Fentanes, del Dr. Carlos Felipe Peña Malacara y la Dra. Norma Adriana Valdez Cruz.