**Efecto de la sobreexpresión del gen codificante de la epimerasa AlgE5 en la proporción G/M del alginato producido por *Azotobacter vinelandii***

Eduardo Hernández Ojedaa, Ricardo Corbinaud Antuneza,b, Ana Zúñigac, Maria Soledad Morenod, Daniel Segurad, Álvaro Díaz-Barrerae, Danilo Pérez Pantojaa,f

a*Instituto Universitario de Investigación y Desarrollo Tecnológico (IDT), Santiago, Chile*

b*Universidad Adolfo Ibañez, Doctorado en Sistemas Complejos, Santiago, Chile*

*cCentre de Biologie Structurale (CBS), Université de Montpellier, INSERM, Montpellier, Francia*

d*Universidad Nacional Autónoma de México, Departamento de Microbiología Molecular, Cuernavaca, México.*

*eEscuela de Ingeniería Bioquímica, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, Chile.*

*fCenter of Applied Ecology and Sustainability (CAPES), Santiago, Chile*

*e-mail:* e.hernandezo@utem.cl

El alginato es un biopolímero conformado por residuos de ácido manurónico (M) y su epímero ácido gulurónico (G). Los residuos G son capaces de interactuar con metales catiónicos divalentes para formar un hidrogel, lo que permite su aplicación como material de soporte en el área biomédica. Un incremento de residuos G en la cadena polimérica aumenta la rigidez del hidrogel generado, lo que favorecería ciertas aplicaciones [1]. La bacteria *Azotobacter vinelandii* es capaz de sintetizar alginato, y posee enzimas encargadas de la epimerización de M a G, incluyendo 7 isoenzimas (AlgE1-E7). Las epimerasas que producen mayor cantidad de bloques G son AlgE2 y AlgE5 [2]. En este trabajo se propuso que la sobreexpresión del gen *algE5* podría causar un incremento en la proporción G/M del polímero producido. Con este propósito, se llevó a cabo el clonamiento del gen *algE5* en un vector de expresión heteróloga, pSEVA258, poseyendo un sistema de expresión controlado por m-toluato cómo inductor. Esta construcción fue transformada en *A. vinelandii* ATCC 9046 para lograr la sobreexpresión del gen *algE5*. Simultáneamente, se construyó también una cepa de *A. vinelandii* portando el vector pSEVA258 vacío a modo de control. Ambas cepas fueron cultivadas en matraces conteniendo 50mL de medio Burk-Sacarosa durante 30 horas, incluyendo el inductor m-toluato a partir de 3 horas de iniciado el cultivo. La expresión del gen *algE5* se determinó a través de RT-PCR cuantitativo. Adicionalmente se recuperó y filtró el alginato producido en cada uno de estos cultivos para estimar mediante FTIR su proporción G/M. Se observó una expresión relativa de 140 veces del gen *algE5* en la cepa modificada respecto a la cepa control. En relación con la proporción G/M, se verificó que el alginato producido por la cepa modificada poseía un valor de 0,92±0,01, en contraste con el valor 0,85±0,01 de G/M producido por la cepa silvestre. Estos resultados indican que la sobreexpresión del gen *algE5* logra incrementar la proporción G/M del alginato producido. Sin embargo, estudios adicionales deben efectuarse para confirmar esta observación preliminar.

Agradecimientos: Este trabajo fue financiado por los proyectos FONDECYT 1240415 y 1231075, ANID-PIA BASAL FB0002 y FORTALECIMIENTO A LOS PROGRAMAS DOCTORADO 2022 ANID FPD 86220037.

Referencias:

[1] A. C. Hernández-González, L. Téllez-Jurado, and L. M. Rodríguez-Lorenzo, “Alginate hydrogels for bone tissue engineering, from injectables to bioprinting: A review,” Feb. 01, 2020, *Elsevier Ltd*. doi: 10.1016/j.carbpol.2019.115514.

[2] H. K. Høidal, B. Iren, G. Svanem, M. Gimmestad, and S. Valla, “Mannuronan C-5 epimerases and cellular differentiation of Azotobacter vinelandii,” 2000.