



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO



PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
AREA TEMÁTICA EN BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA

PROCESO PARA LA OBTENCIÓN DE LEVANAS POR SÍNTESIS *DE NOVO*
UTILIZANDO SACAROSA COMO SUSTRATO

Tesis que presenta:

I.B.Q. BLANCA MARISOL DOMÍNGUEZ MARTÍNEZ

Para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Opción en:

BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA

Asesor de tesis:

D.C. CARLOS RUBÉN SOSA AGUIRRE

Coasesor de tesis:

D.C. JUAN JOSÉ VALDEZ ALARCÓN

AGOSTO DE 2011

AGRADECIMIENTOS

Agradezco primeramente a mi padre por inculcarme el amor al trabajo y al estudio, y por apoyarme en cada proyecto de mi vida, a mi madre que cada día me demuestra todo el amor que me tiene.

A mis hermanos que han sido apoyo fundamental a lo largo de mi vida.

A mis amigas que han hecho este viaje maravilloso.

A mis compañeros de laboratorio por hacer más ameno el trayecto.

Al Dr. Carlos Sosa por guiarme sabiamente y ayudarme a ser independiente.

Al Dr. Juan José Valdez por brindarme en todo momento su apoyo.

A mis revisores de tesis, el Dr. Carlos Cervantes que estuvo guiándome desde el inicio.

Al Dr. José Salud por sus valiosas aportaciones.

A todas las personas que indirectamente han colaborado en este proyecto como el Dr. Jesús Campos por su valiosa ayuda, a Lore por su apoyo incondicional, a la Dra. Judit que me apoyo desde que la conocí, a Lili que siempre ha tenido la disposición para ayudar.

En especial quiero agradecer a Lourdes Velázquez que fue pieza clave en el desarrollo de este trabajo, gracias por aportarme tus conocimientos.

Y por último pero no menos importante al amor de mi vida que siempre me ha apoyado incondicionalmente y a quien admiro secretamente, gracias Victor por todo tu apoyo.

ÍNDICE

Contenido

I. RESUMEN	4
II. SUMMARY	6
III. INTRODUCCIÓN	8
III.1.- Levanas	8
III.2.- Aplicaciones de las levanas en la salud	10
III.2.1.- Efecto prebiótico	10
III.2.2.-Metabolismo de lípidos	11
III.2.3.- Absorción de minerales.....	11
III.2.4.- Industria alimentaria.....	11
III.2.5.- Industria cosmética	12
III.2.6.- Actividad antitumoral.....	12
III.2.7.- Expansor del volumen plasmático en sangre.....	12
III.2.8.- Adhesivos y películas.....	13
III.3.- Bacterias productoras de fructosiltransferasas bacterianas	13
III.4.- <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	15
III.5.- Metabolismo del carbono.....	17
III.6.- Fructosiltransferasas	18
III.7.- Mecanismo de reacción.....	20
III.8.- La levansacarasa de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	22
III.9.- Métodos para la producción de levanas	24
III.9.1.-.- Métodos para incrementar la síntesis enzimática de levanas	24
III.9.2.-.-Inmovilización enzimática	25

III.9.3.- Métodos de inmovilización enzimática	27
IV.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
IV.1.- Condiciones de cultivo	28
IV.2.- Análisis de biomasa	28
IV.3.- Constantes cinéticas	31
IV.4.- Determinación de la concentración de biomasa en matraces	31
IV.5.- Análisis de carbohidratos	32
IV.6.- Inmovilización enzimática.....	33
IV.6.1.- Obtención del medio de cultivo con LsdA.....	33
IV.6.2.- Concentración proteica por micro y ultrafiltración	34
IV.6.3.- Diálisis	34
IV.6.4.-Inmovilización enzimática	35
IV.6.5.-Determinación de actividad enzimática	35
V. HIPÓTESIS.....	36
VI. OBJETIVOS.....	36
VI.1.- General	36
VI.2.- Específicos.....	36
VII.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
VII.1- Curva de crecimiento.....	37
VII.2.- Tasa específica de crecimiento	39
VII.3.- Análisis por HPLC.....	41
VII.4.- Curvas de producción de carbohidratos	44
VII.5.- Parámetros cinéticos	46
VII.6.-Tasa de cambio de sacarosa.....	47
VII.7.-Tasa de cambio de glucosa y fructosa	48

VII.8.-Tasa de cambio fructanos	49
VII.9.- Rendimiento de fructanos con respecto a sacarosa	50
VII.10.-Rendimiento de biomasa	51
VII.11.- Análisis por cromatografía de capa fina (TLC)	52
VII.12.- Determinación de concentración de proteína	58
VII.13.- Determinación de glucosa	59
VII.13.1.-DNS	59
VII.13.2.-HPLC	61
VII.13.3.- Ensayo enzimático.....	62
VII.13.3.- Actividad enzimática	63
VII.13.1.-TLC	63
VII.13.2.-DNS	69
VII.13.3.-HPLC	70
VII.13.4.- Ensayo enzimático.....	70
VII.14.- Determinación de FOS y levanas por medio de HPLC.....	71
VII.15.- Discusión general.....	73
VIII.-CONCLUSIONES	75
IX. PERSPECTIVAS	77
X. REFERENCIAS Y BIBLIOGRAFÍA	78
XI.- APENDICE A.....	88
XI.1.- Curva de calibración peso seco vs densidad óptica	88
XI.2.- Curva de calibración para determinación de proteína por el método de Bradford	88
XI.3.- DNS Curva de calibración de glucosa	89
XI.4.- DNS Curva de calibración de Fructosa.....	90

I. RESUMEN

En la actualidad el consumidor es más consciente de la relación existente entre su salud y su dieta, lo cual ha impulsado el desarrollo de los alimentos funcionales. Dentro de este grupo encontramos algunos fructanos como inulina, fructooligosacaridos (FOS) y levanas. Estos compuestos prebióticos han recibido gran atención por sus diversos efectos benéficos para la salud del consumidor. La demanda de las levanas está aumentando, sobre todo por su uso extendido en la industria alimentaria, así como en las industrias cosmética y médica, por lo cual se está buscando condiciones para la producción de éstas a mayor escala para hacerla más viable. La producción de levanas para aplicaciones industriales puede llevarse a cabo mediante síntesis por la acción de enzimas aisladas o síntesis por fermentación sumergida con microorganismos. El objetivo de este trabajo es el desarrollo de un proceso continuo que incremente la producción de levanas. Para ello se utilizó la cepa *G. diazotrophicus* PAI 5, en medio de cultivo LGIE suplementado con glicerol para producción de biomasa (Cavalcante and Döbereiner 1988), y se adicionó sacarosa para la síntesis de levanas. La fermentación se desarrolló en matraces agitados a 150 rpm y una temperatura de 30°C, pH 6, manteniéndose como mínimo por 90 horas. La concentración de biomasa se evaluó por medición de absorbencia a 590 nm cada 12 horas, y los carbohidratos sintetizados se analizaron por cromatografía de alta resolución de líquidos (HPLC) y cromatografía de capa fina (TLC). La fase estacionaria de la curva de crecimiento de *G. diazotrophicus* se presentó entre las 60 y 80 h de incubación y la velocidad máxima de crecimiento (μ_{max}) aquí obtenida se alcanzó dentro de las 19 h, con valor de $0.0365h^{-1}$ con glicerol y entre las 26 a 34 h, con valores de $0.0135h^{-1}$ con sacarosa. Se demostró que en estas condiciones de cultivo existe acumulación de levanas y FOS en el medio. Para la inmovilización enzimática se utilizó un extracto microfiltrado con una membrana de polietilensulfona (PES) de 0.2 μm , el cual se concentró con una membrana de 10 KDa de PES. El concentrado se dializó por 24 h en una solución amortiguadora de acetato de sodio 0.02 M con cuatro cambios de solución cada 8 h a 4 °C. Como soportes para la inmovilización se utilizaron agarosa 1%, 2, 3 y 4%, y la síntesis de levanas se analizó mediante TLC. La actividad de la levansacarasa se cuantificó con

la medición de la glucosa liberada acoplada de la actividad hidrolítica de la levansacarasa a un ensayo enzimático de reducción de NAD^+ . Y también se determinó mediante la glucosacuantificación de la liberada mediante HPLC y DNS. Una unidad de Levansacarasa es definida como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de glucosa por minuto bajo las condiciones de reacción analizadas. Los estudios mediante el ensayo enzimático, TLC, HPLC y DNS determinaron que el mejor método de inmovilización fue el de agar al 2%, sobre los demás ensayos con agar y agarosa, Agar 2% fue en el que se obtuvo mayor eficiencia alcanzando actividades totales de 4.8 U/mL a los 18 min y 34 U/mL a las 24 h. En cuanto a la síntesis de los FOS y levanas la mayor cantidad de estas la produjo el ensayo con los inmovilizados en agarosa al 1%, seguido muy de cerca por el ensayo con inmovilizados con agar al 2%.

II. SUMMARY

Nowadays consumers are more conscious about the relationship between their health and diet, which has promoted the development of functional foods. This group includes some fructans like inulin, fructooligosaccharides (FOS) and levans. As prebiotics, levans have received great attention for their beneficial effects on consumer's health. Demand for levans is increasing, mainly because of its widespread use in the food industry, as well as in cosmetic and medical industries, so the development of production of levans at larger scales is being implemented to make it more viable. Among production methods of levans for industrial application, enzymatic synthesis and submerged fermentation with levansucrase-producing microorganisms have been described. Our goal is the development of a continuous process which increases the levan production from *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *G. diazotrophicus* PAI 5 strain was cultured on LGIE medium supplemented with glycerol. Sucrose was used as substrate for levan synthesis. Fermentation was conducted in shaken flasks at 150 rpm with a temperature of 30°C and initial pH of 6, for a minimum of 90 hours. The biomass concentration was evaluated by measuring absorbance at 590 nm every 12 hours. The absorbance values were converted to dry weight (g/L) using a calibration curve based on gravimetric measurements of dry samples of *G. diazotrophicus*. The residual and produced carbohydrates were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) and thin layer chromatography (TLC). The data derived from the fermentation experiments were analyzed with the purpose of kinetically characterize the process and propose strategies for a better performance. The growth of *G. diazotrophicus* presented its stationary phase between 60 and 80 hours of incubation. The maximum growth specific rate (μ_{max}) of *G. diazotrophicus* with glycerol was 0.0365 h⁻¹, between 26 to 34 hours of culture, and the μ_{max} of *G. diazotrophicus* with sucrose was 0.0135 h⁻¹. The accumulation of levans and FOS in the medium was demonstrated under these conditions. For enzymatic immobilization, cell extract was microfiltered through a membrane of 0.2 μ m of PES, concentrated with a membrane of 10 kDa of PES and

dialyzed. Immobilization was made using 1% agarose or 2, 3 and 4% agar. Carbohydrates produced were analyzed by TLC. Levansucrase activity was measured as the glucose released from sucrose hydrolysis with a glucose oxidase–peroxidase coupled colorimetric kit (Sigma). The enzyme activity was determined under the following conditions: 0.25 M sucrose in 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.2 at 40°C, levansucrase (LsdA) concentration was 1 μ M. Enzyme activity was also determined by the glucose released quantified by HPLC and DNS. One unit of LsdA is defined as the amount of enzyme releasing 1 μ mol of glucose per min based on initial velocity measurements under the conditions described above. All studies using the enzyme assay, TLC, HPLC and DNS showed that the best method of enzyme immobilization was that using 2% agar, which showed the highest activity, reaching a total activity of 4.8 U/mL at 18 min and 34 U/mL at 24 h.

Las levanas son fructanos con características diferentes a otros polisacáridos, que lo hacen un polímero interesante para la industria y para su estudio en modelos biológicos. Las características interesantes de las levanas son sus propiedades reológicas como su viscosidad intrínseca, solubilidad y la resistencia a la tracción. La viscosidad es una propiedad de los líquidos y gases newtonianos que se relaciona con su resistencia al flujo. La viscosidad depende del solvente en que se resuspende el polímero. Para calcular este valor se cuantifica la viscosidad relativa. La viscosidad relativa es la relación entre la viscosidad de una disolución y la viscosidad del disolvente. También la viscosidad depende la concentración del polímero ya que el incremento de la concentración aumenta las interacciones entre las cadenas (Acosta, 2005). Como función de la concentración del polímero contra la viscosidad relativa, se obtiene una recta y que al extrapolarla al eje de la viscosidad relativa, la concentración del polímero tiende a cero, obteniendo un número de viscosidad límite o viscosidad intrínseca. La viscosidad intrínseca es un índice directo del volumen ocupado por moléculas individuales del polímero. La viscosidad intrínseca de la levana es $[\eta] \approx 0.17 \text{ dl g}^{-1}$ (a 20°C), valor relativamente bajo para un polímero tan grande como la levana; esto indica que cada molécula de levana está muy compacta (Kasapis *et al*, 1994). Es soluble en agua, no se disuelve en la mayoría de los solventes orgánicos y no la afectan los alcoholes. Tiene una resistencia a la tracción relativamente alta de 991 psi, comparada con la inulina de 124 psi y la goma de xantana de 33 psi. Esta característica ha llevado a la elaboración de pegamentos a base de levana. También se elaboran películas mezclando la levana con el glicerol (Barone y Medynets, 2007). Las propiedades reológicas de las levanas al tener una baja viscosidad intrínseca y la resistencia a la tracción relativamente alta, tal vez sean las responsables del comportamiento de exclusión e incompatibilidad con polisacáridos de plantas como la pectina (Kasapis *et al*, 1994). La alta compactación de la levana y la interacción intermolecular producen una red estable difícil de deformar (Velázquez-Hernández *et. al.* 2011).

III.2.- Aplicaciones de las levanas en la salud

Existe mucha información concerniente a la significancia de las levanas en la modulación de varias funciones del cuerpo humano (Velázquez-Hernández *et al.* 2009). Sus efectos incluyen actividades antitumorales (Yoon *et al.*, 2004), actividad de inmunoestimulación (Xu *et al.*, 2006), metabolismo de lípidos (Yamamoto *et al.*, 1999) y su actividad prebiótica (Bello *et al.*, 2001) entre otras, a continuación se describen algunas de ellas.

III.2.1.- Efecto prebiótico

Los prebióticos son compuestos alimentarios no digeribles que benefician al consumidor mediante la estimulación selectiva del crecimiento o actividad de una población bacteriana particular en el colón (Gibson y Roberfroid, 1995). Para otorgarle la clasificación de prebiótico a un alimento o ingrediente alimenticio se requiere de una demostración científica de que éste: 1) resiste la acidez gástrica, hidrólisis de enzimas de mamíferos y absorción gastrointestinal; 2) es fermentado por la microflora intestinal; 3) estimula selectivamente el crecimiento y/o actividad de bacterias intestinales asociadas con la salud y bienestar del hospedero; 4) debe inducir efectos locales o sistémicos en el organismo que contribuyan a mejorar la salud.

Kang *et al.* en el 2009 sugirieron que los efectos fisiológicos de las levanas dependen de su tamaño, tipo de enlace y fermentabilidad. Estudios *in vitro* probaron la fermentabilidad de varias levanas y oligosacáridos de levanas que se realizaron en cultivos puros que incluyen *Bifidobacterium adolescentis*, *B. longum*, *B. breve*, *B. pseudocatenulatum*, *Lactobacillus plantarum* y *Pediococcus pentosaceus* (Marx *et al.*, 2000; Kang *et al.*, 2002). También sugirieron que las levanas mediante la hidrólisis ácida en el estómago producen polímeros de tamaño más pequeño u oligosacáridos, los cuales subsecuentemente son utilizados completamente por bacterias en el lumen del intestino. Experimentos *in vivo* con ratas demostraron que la concentración de ácidos grasos de cadena corta (SCFAs) en el ciego fue dos veces más alta con la dieta de levanas comparado con la dieta control, principalmente debido a la formación de acetato y butirato (Jan *et al.*, 2002).

Los beneficios de la ingesta de fructanos se derivan de su capacidad para aumentar la población de bifidobacterias y lactobacilos pertenecientes a la flora benéfica del intestino grueso, que suprimen la actividad de las bacterias de putrefacción y reducen la formación de productos tóxicos de fermentación (Tomomatsu, 1994). Jang et al. (2002) adicionaron el 7% de Levanas a la dieta básica de las ratas Sprague-Dawley, encontraron que la dieta de levanas estimulaba el crecimiento de bifidobacterias en el ciego (Tomomatsu, 1994). Estos resultados indican que la ingesta de levanas estimula el crecimiento de bacterias productoras de ácido láctico en el ciego, y por lo tanto mejoran las condiciones intestinales de las ratas.

III.2.2.-Metabolismo de lípidos

Yamamoto *et al.*, (1999) y Kang *et al.* (2004) al administrar levanas de peso molecular alto (ca. 2, 000,000); en dosis de 1% o 5% a ratas observaron una disminución de los niveles de colesterol en suero de 59% y 83% respectivamente, lo cual se correlacionó con el aumento de la excreción de lípidos en heces. Lo anterior sugiere que la levana se une a los esteroides en el intestino grueso impidiendo su reabsorción. Estos resultados se complementaron con evidencias de que la levana se une al taurocolato *in vitro*. Estudios en humanos con dieta de administración de levanas (5.5-6 g, dos veces al día) por 2- 3 meses mostraron que éstas redujeron el peso corporal y masa de grasa corporal (Kang *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2003).

III.2.3.- Absorción de minerales

En algunos estudios en ratas, el consumo de levanas incrementó la absorción de los niveles de cationes divalentes como Zn, Mg, Fe (Kim *et al.*, 2004) y Ca (No *et al.*, 2007) en ratas. A la fecha no se han reportado estudios de biodisponibilidad de minerales en humanos.

III.2.4.- Industria alimentaria

La aplicación de levanas en la industria alimentaria incluye usos como estabilizante, emulsificante, ayuda en formulación, agente de terminaciones de superficies, agente encapsulante y potenciador de sabores y fragancias (Han, 1990).

Los exopolisacáridos (EPS) entre ellos las levanas han sido usados para mejorar la consistencia y viscosidad así como para evitar la sinéresis del yogurt. También para la producción de productos lácteos fermentados y quesos, los EPS son usados en cultivos iniciadores (Marshall y Rawson, 1999).

III.2.5.- Industria cosmética

Debido a su poca reactividad biológica, las levanas se han usado como un ingrediente activo en la formulación de cosméticos. Se han reportado resultados de estudios en las propiedades cosméticas de levanas producidas por *Zymomonas mobilis* (Kim *et al.*, 2005).

Las levanas demostraron tener efectos protectores celulares en una irritación inducida en piel artificial 3-D, con más del 30% de mejoría en la viabilidad celular, además también mostraron actividad antiinflamatoria en la piel artificial y se comprobó su capacidad humectante (Kang- Soonet *al.* 2009), estas características hacen que las levanas sean incorporadas como ingredientes activos de cremas corporales y faciales.

III.2.6.- Actividad antitumoral

Las levanas tienen actividades biológicas, incluyendo la disminución de infecciones y necrosis de tumores y estimulación e incremento en células de permeabilidad a agentes citotóxicos (Leibovici y Stark, 1985). Calazans *et al.* (1997) postularon que las levanas muestran actividad antitumoral contra el sarcoma 180 y el carcinoma de Ehrlich en ratones albinos Swiss, y propusieron que los efectos pueden estar asociados con el peso molecular específico del polímero.

III.2.7.- Expansor del volumen plasmático en sangre

Las levanas junto con las dextranas, han sido propuestas como expansoras del volumen plasmático en la sangre (Moffitt, 1995), estas pueden reemplazar proteínas normales sanguíneas para la restauración de la presión osmótica en pacientes con sangrado profuso. Este tratamiento es útil para prevenir shock de hemorragias, quemaduras y cirugías, así como para reducir el riesgo de trombosis y embolias.

III.2.8.- Adhesivos y películas

Las levanas están siendo utilizadas para el desarrollo de un adhesivo amigable al medio ambiente usando sus propiedades adhesivas (Combie *et al.*, 2004). La fuerza tensil de las levanas en aluminio y ciertos plásticos son competitivos con muchos adhesivos petroquímicos (Combie and Yavorsky, 2005). Las levanas también son usadas como filmes resistentes al agua para la preservación de alimentos.

Las levanas forman películas cohesivas con glicerol en porcentajes de 20-30% en peso (Barone y Medynets 2007).

III.3.- Bacterias productoras de fructosiltransferasas bacterianas

Todas las fructosiltransferasas bacterianas caracterizadas hasta el presente son del tipo levansacarasa, con excepción de la inulinsacarasa de *Streptococcus mutans* (Sato *et al.* 1984).

Se han encontrado levansacarasas en bacterias Gram-positivas como:

- *Bacillus subtilis* (Dedonder, 1966)
- *Actinomyces viscosus* (Pabst, 1977)
- *Bacillus amyloliquefaciens* (Tang *et al.* 1990)
- *Streptococcus salivarius* (Milward y Jacques, 1990)
- *Bacillus natto* (Takahama *et al.* 1991)
- *Paenibacillus polymyxa* (Bezzate *et al.* 1994)
- *Bacillus circulans* (Pérez-Oseguera *et al.* 1996)
- *Bacillus stearothermophilus* (Li *et al.* 1997)
- *Actinomyces naeslundii* (Bergeron *et al.* 2000)
- *Lactobacillus reuteri* (Van Hijum *et al.* 2001)
- *Streptococcus mutans* la cual produce una inulinasacarasa o inulinsacarasa (Sato *et al.* 1984)

Se ha reportado también la producción de LsdA en varias bacterias Gram-negativas, entre ellas:

- *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Hernández *et al.* 1995)
- *Gluconobacter oxydans* (Elishashvili, 1980)
- *Gluconacetobacter xylinus* (Tajima *et al.* 2000)
- *Erwiniaherbicola* (Cote, 1988)
- *Erwiniaamylovora* (Gross *et al.* 1992)
- *Zymomonasmobilis* (Song *et al.* 1993)
- *Pseudomonas syringae* (Hettwer *et al.* 1998)
- *Rahnellaaquaticus* (Song *et al.* 1998)

Como se mencionó anteriormente una amplia gama de microorganismos producen la actividad de la enzima está implicada en una gran variedad de procesos: la supervivencia de las bacterias en el suelo (*Bacillus subtilis*), fitopatogénesis (*Pseudomonas syringae*) o simbiosis (*Bacillus polymixa*) para las bacterias planta interactivos (Hernández *et al.* 1995).

Hernández *et al.* (1995) hicieron una comparación entre las levanas provenientes de la levansacarasa de *G. diazotrophicus* y las provenientes de levansacarasa de *Bacillus subtilis*, las dos enzimas dieron diferentes patrones de los productos (Fig. 1) determinaron que las levanas de la levansacarasa de *G. diazotrophicus* liberan grandes cantidades de kestosa a partir de sacarosa en la fase inicial. Los fructanos provenientes de las levansacarasas de *B. subtilis* sintetizaron fructanos con grados de polimerización mayores de 15, tan pronto como se inició la reacción. Los oligofructanos con un grado de polimerización más bajo no se acumularon. En contraste con las levansacarasas de *G. diazotrophicus* que libera grandes cantidades de 1-kestosa y kestotetrosa las cuales se acumularon en la mezcla de reacción. Los fructanos con alto grado de polimerización fueron sintetizados durante las etapas posteriores de la reacción.

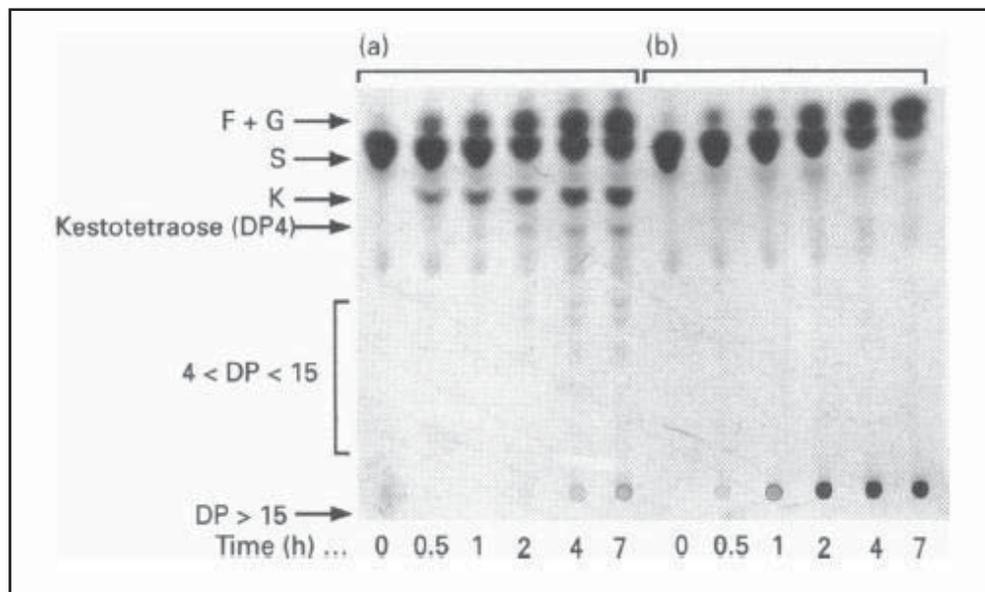


Fig.2.- Placa de cromatografía de capa fina donde se muestra la síntesis de fructanos por levansacaros de *Gluconacetobacter diazotrophicus* (a) y *Bacillus subtilis* (b), F=fructosa, G=glucosa, S=sacarosa, K=kestosa, DP=grado de polimerización (Hernandez *et al.* 1995)

Ambas enzimas sintetizan levanas con pesos moleculares altos, sin embargo 1-kestosa fue un mejor aceptor para la levansacarasa de *B. subtilis* que para la LsdA de *G. diazotrophicus* debido a que las cantidades de 1-kestosa y kestotetraosa marcadas para el ensayo permanecieron sin modificar, esto significa que las dos levansacarasa no pueden utilizar 1-kestosa y kestotetraose como donante fructosilo en las condiciones experimentales. Esto nos indica que hay acumulación de FOS así como de levanas en el mediado por la LsdA de *G. diazotrophicus* a diferencia de las síntesis de fructanos por *B. subtilis*.

III.4.- *Gluconacetobacter diazotrophicus*

La producción de levanas se puede llevar a cabo a través de procesos fermentativos utilizando la bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Esta bacteria secreta extracelularmente la enzima levansacarasa (LsdA) que es la responsable de la síntesis de fructanos como levanas y fructooligosacaridos (FOS) a partir de sacarosa. A continuación se hará una breve descripción de esta bacteria.

Gluconacetobacter diazotrophicus expresa de forma constitutiva la levansacarasa (EC 2.4.1.10) extracelular, denominada LsdA, que es la responsable de la síntesis de

las levanas mediante la utilización de sacarosa como fuente de carbono. Esta bacteria Gram negativa no dispone de un mecanismo de transporte de sacarosa al interior de la célula (Álvarez y Martínez-Dretz, 1995) y para utilizar este carbohidrato como fuente de carbono depende de la producción extracelular de la levansacarasa (Hernández, 1999). Esta enzima se identificó en la cepa SRT4, aislada de tallos de caña de azúcar en la Habana (Coego y cols., 1992; Hernández, 1999). La enzima se secreta al medio de cultivo donde puede representar más del 70% de la proteína extracelular total (Menéndez 2004), cuando el medio de cultivo contiene glicerol (Hernández et al, 1995). La LsdA hidroliza la sacarosa conduciendo a la liberación de glucosa unido a la producción de fructosa de fructooligosacáridos (FOS) y de levanas en proporciones que varían dependiendo de la concentración del sustrato y de la temperatura de la reacción (Hernández *et al.* 1999).

G. diazotrophicus se detectó por primera vez en aislamientos ramificados a partir de plantas de caña de azúcar en diferentes estados de Brasil y se nombró *Saccharobacternitrocaptans* (Cavalcante y Döbereiner, 1988). Posteriormente la bacteria se ha renombrado como *Acetobacter diazotrophicus* (Gillis *et al.* 1989) y *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Yamada y cols., 1998), que pertenece a la familia Acetobacteraceae, incluida en la subdivisión alfa del *phylum* *Protobacteria*

Las características principales observadas en la especie fueron las que a continuación se enumeran:

1. Capacidad de fijar N₂,
2. Crecimiento óptimo en medios ácidos
3. Posibilidad de oxidar el etanol, primero hasta ácido acético y luego hasta CO₂ y agua.

Este microorganismo fue descrito como un bacilo Gram negativo con actividad diazotrófica, con forma de cilindro recto de extremos redondeados de 0,7-0,9 μm de largo (Fig. 3) y móvil con flagelación lateral o peritrica. Con un crecimiento óptimo a pH 5.5 y temperatura de 30°C, produce ácido 2-cetoglucónico y ácido 2,5-cetoglucónico a partir de glucosa. Libera ácido acético y forma colonias de color amarillo-naranja en medio LGI sólido suplementado con el indicador de pH azul de bromotimol. En condiciones micro aeróbicas reduce N₂, lo que le permite crecer en

medios carentes de compuestos nitrogenados. No consume nitratos debido a la ausencia de nitrato reductasa (Calvancante & Döbereiner, 1988).

Esta bacteria, tolera tratamientos con calor y salinidad, pero la actividad de nitrogenasa y algunas enzimas del metabolismo del carbono se afectan por altas concentraciones de cloruro de sodio (150 a 200 mmol^{-1}).

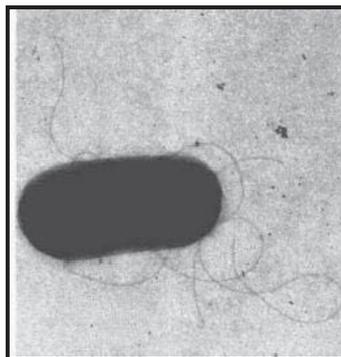


Fig.3.- Micrografía electrónica de *Gluconacetobacter diazotrophicus* tomada por Dong *et al.* en 1994

III.5.- Metabolismo del carbono

La bacteria *G. diazotrophicus* puede utilizar diferentes fuentes de carbono como: sacarosa, glucosa, fructosa, gluconato, sorbitol, glicerol y manitol (Gillis *et al.* 1989; Stephan *et al.* 1991; Ureta *et al.* 1995). En cambio no puede consumir los ácidos dicarboxílicos (succinato, fumarato y malato) esto se debe a la falta de un sistema para transportarlos al interior de la célula (Álvarez y Martínez-Drets, 1995). Este aspecto diferencia a esta especie de otras bacterias diazotróficas.

La sacarosa constituye la principal fuente de carbono de la que dispone la bacteria en su hábitat, el apoplasto de la caña de azúcar (Dong *et al.* 1994; 1995). La hidrólisis de la sacarosa requiere de la acción de enzimas extracelulares, dada la carencia de un sistema de transporte de este carbohidrato hacia el interior de la célula (Álvarez y Martínez-Drets, 1995). En condiciones de vida libre, *G. diazotrophicus* tolera presiones osmóticas de hasta 30% de sacarosa en el medio y su crecimiento es óptimo a concentraciones del 10% (Gillis *et al.* 1989).

III.6.- Fructosiltransferasas

Las fructosiltransferasas (FTF) son enzimas que sintetizan fructooligosacáridos (FOS) y fructanos. Los FOS son carbohidratos con menos de 9 monómeros y los fructanos son homopolisacáridos que van desde 10 hasta más 100 residuos de fructosa. Las FTF pertenecen a la familia de glicosil hidrolasas denominada GH68 (Lammens *et al*, 2009). Las FTF hidrolizan el sustrato sacarosa y transfieren el grupo fructosilo liberado a otra sacarosa en el residuo de fructosa u otros receptores (Van Hijum *et al*, 2006).



Ecuación 1

Las FTF se han aislado en plantas, bacterias y hongos. Para la síntesis de fructanos en plantas se requiere de al menos dos FTF, una que hidroliza la sacarosa y otra que transfiere los residuos de fructosa (Vijn and Smeekens, 1999). En bacterias y hongos solo se requiere de una enzima llamada levansacarasa, inulosacarasa o fructosiltransferasa.

Las fructosiltransferasas bacterianas en general tienen pesos moleculares entre 45 y 64 kDa, aunque las producidas por bacterias ácido lácticas suelen tener pesos moleculares superiores (de 80 a 170 kDa). La mayoría de estas enzimas son extracelulares, es decir, son secretadas al medio de cultivo cuando crecen las bacterias; otras se quedan asociadas a la pared celular. En el extremo amino de la cadena de proteína cuentan con un dominio amino con un plegamiento conocido como del tipo “ β -propela”, que es el sitio donde se lleva a cabo la catálisis. En algunos casos, en el extremo carboxilo de la cadena de proteína se encuentra una región cuya función no se ha definido del todo, pero puede servirle para anclarse a la pared celular. Las FTF bacterianas, dentro de este grupo la LsdA, han sido clasificadas dentro de la familia 68 de las glicósido-hidrolasas. Se trata de una

clasificación de las enzimas basada en su estructura tridimensional obtenida una vez que la enzima logró ser cristalizada.

Martínez-Fleites *et al.* en 2005 reportaron la estructura cristalográfica de la levansacarasa de *Bacillus subtilis*, la primera de esta familia: esta enzima presenta una estructura de tipo β -propela con cinco “hojas” que adopta una topología en “W” de cuatro hebras β -antiparalelas, como puede observarse en la Fig. 4, donde también se aprecia una cavidad central en forma de embudo.

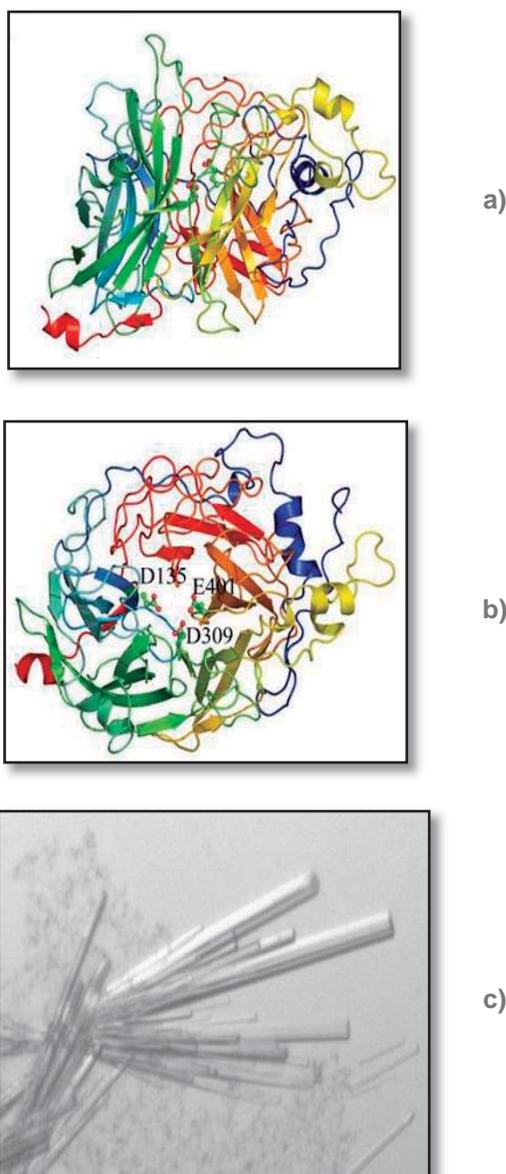


Fig. 4.-a) Vista lateral de la representación esquemática de la proteína LsdA, b) vista superior, en el sitio catalítico se observan dos residuos de ácido aspártico y un residuo de ácido glutámico conforman el sitio activo. EC 2.4.1.10 c) Micrografía de los cristales formados por LsdA Martínez-Fleites *et al.* (2005)

La FTF de plantas tienen un peso molecular promedio de 70 kDa y, según análisis de modelado con la fructan 1-exohidrolasa de *Chicoriumintybus*, parecen estar constituidas por dos dominios: el dominio catalítico, con el ya conocido plegamiento del tipo β -propela, como las FTF bacterianas, pero en este caso seguido en las FTF de mohos y plantas se reconocen seis regiones muy parecidas (se dice conservadas), en tres de las cuales se ubican los posibles aminoácidos que están implicados en la catálisis.

En presencia de sacarosa, y dependiendo de las condiciones de reacción, las fructosiltransferasas son capaces de realizar varias reacciones: pueden sintetizar un polímero, transfiriendo la fructosa a las cadenas que van creciendo, o bien, pueden hidrolizar la sacarosa. Cuando se agrega una molécula ajena al medio de reacción, “aceptor”, la enzima puede transferirle también fructosa, dando lugar a la molécula fructosilada, es decir, un “fructósido”.

III.7.- Mecanismo de reacción

Una propuesta sobre el mecanismo de reacción de estas enzimas fue planteada por Chambert y Treboul en 1977 quienes sugieren, a partir de estudios cinéticos en velocidad inicial, que el comportamiento es del tipo “Ping-Pong Bi- Bi” (Fig. 5). En éste se plantea que la enzima y la sacarosa forman un intermediario enzima-fructosa (Ping), y se libera la glucosa (Pong), este complejo interacciona, por ejemplo, con una molécula de agua (Ping) y la fructosa es entonces transferida liberando un segundo producto: la fructosa (Pong). Este segundo producto puede ser la cadena de fructosas que crece o el fructósido. Es de hacer notar que cuando el segundo sustrato es la cadena de fructosa, el producto es la misma cadena adicionada de una molécula de fructosa. Una de estas regiones permite a la enzima unirse a la sacarosa (se le denomina “caja de sacarosa”). Curiosamente, dada la similitud entre la estructura de estas enzimas (las FTF de mohos y plantas) y la de las enzimas que hidrolizan sacarosa (invertasa) y otros fructósidos, están clasificadas dentro de la familia 32 de las glicósido hidrolasas.

En medio de la β -propela que constituye el dominio catalítico, se encuentran dos aminoácidos muy importantes: un ácido aspártico en la posición 86 y otro en la 247 (D86 y D247) y un glutámico en la posición 342 (E342), siguiendo la numeración de los aminoácidos de la proteína de *B. subtilis*, todos ellos implicados en la catálisis. Como ya señalamos al describir la reacción, ésta se lleva a cabo en dos pasos: la sacarosa (glucosa-fructosa) entra al sitio activo, interacciona con él, y se forma un enlace covalente entre la fructosa y la enzima; pues bien, ahora se sabe que este enlace es con el aspártico 86, siendo así que la enzima une covalentemente a la fructosa. En el segundo paso, una nueva molécula de sacarosa se acopla al sitio activo, en el sitio donde antes se encontraba la glucosa: la fructosa unida a D86 es entonces transferida. Se sabe que el aspártico 247 estabiliza el estado de transición entre estos dos pasos. En la Fig.5 se ilustra el mecanismo de polimerización de la LsdA de *Bacillus megaterium*.

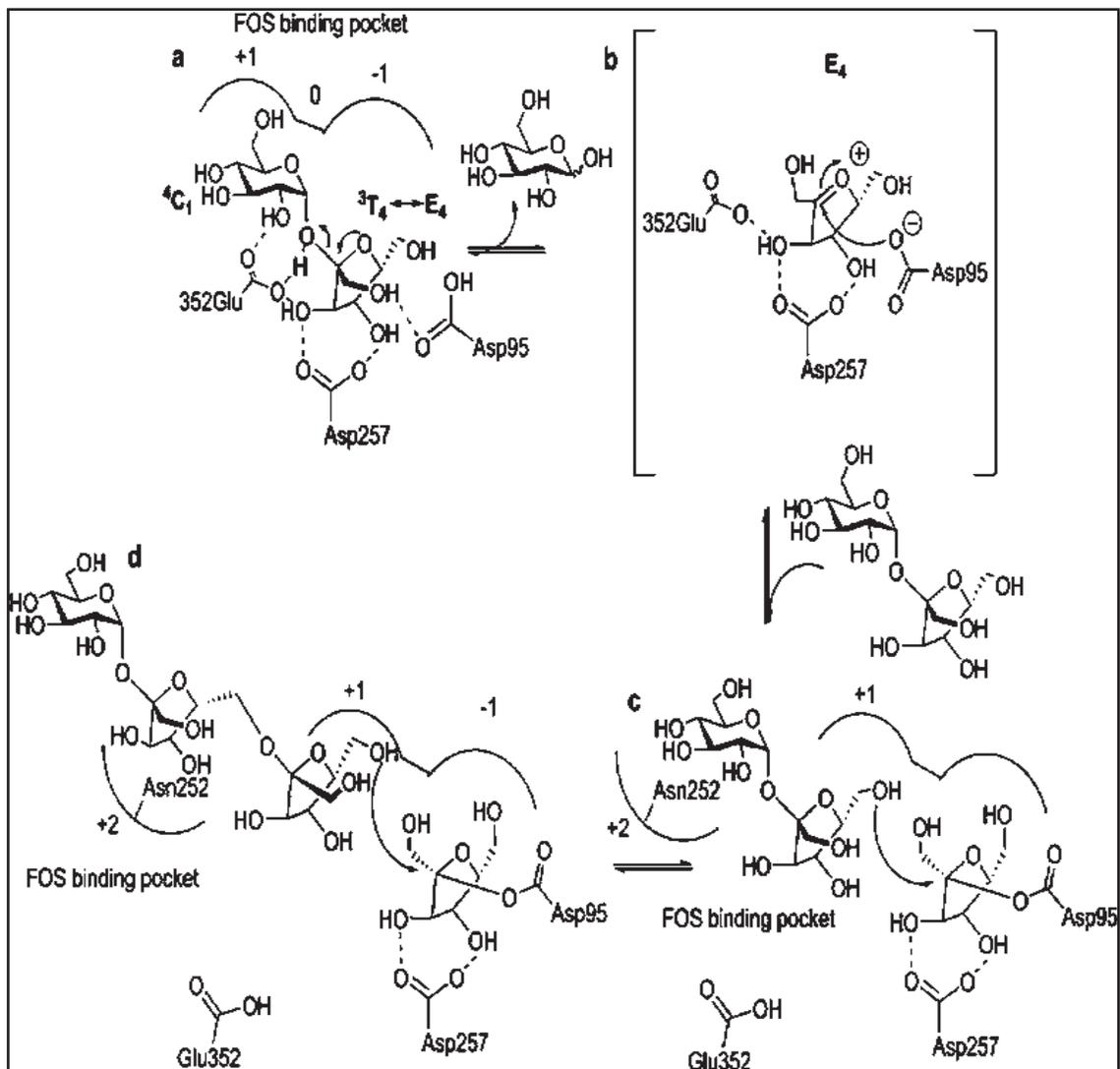


Fig. 5.- Modelo para explicar el mecanismo de polimerización descrito por Homann *et al.* (2007)

III.8.- La levansacarasa de *Gluconacetobacter diazotrophicus*

G. diazotrophicus produce la enzima extracelular, la levansacarasa o LsdA (sacarosa-2,6- β -fructano-6- β -D-fructosiltransferasa), la cual utiliza como sustrato la sacarosa para sintetizar fructooligosacáridos (FOS) 1-nistosa y kestosa y el fructano levana con enlaces $\beta(2 \rightarrow 6)$ (Hernández *et al.*, 1995). Es la única enzima que tiene *G. diazotrophicus* para hidrolizar la sacarosa ya que carece de un sistema de transporte de la sacarosa y representa el 70% de la proteína secretada al medio de cultivo cuando se adiciona glicerol (Hernández *et al.*, 1995).

La levansacarasa de *G. diazotrophicus* es la única exoenzima reportada hasta el momento, dentro de las fructosiltransferasas de bacterias Gram negativas que tiene un péptido señal para su secreción (Hernández *et al*, 1999). La levansacarasa de esta bacteria, cuyo sustrato es la sacarosa, es una enzima monomérica de 58 kDa, tiene un pH óptimo de 5 y no requiere algún metal como cofactor. La K_m es 11.8 mM, k_{cat} de $3.6 \times 10^3 \text{ min}^{-1}$ y k_{cat}/K_m de $3.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (Hernández *et al*, 1995; Velázquez-Hernández *et al*, 2009). La levansacarasa es el mecanismo de ping-pong (Fig. 6), por esta razón la enzima lleva a cabo reacciones de transfructosilación de la fructosa a diferentes aceptores (Hernández *et al*, 1995). El mecanismo para la levansacarasa es como sigue: el primer sustrato es la sacarosa que reacciona con la enzima y libera glucosa como primer producto, mientras el residuo de fructosa permanece unido covalentemente a un aminoácido en la enzima. En la segunda etapa, el residuo de fructosa unido a la enzima es transferido al segundo sustrato (aceptor) que puede ser agua, otra molécula de sacarosa, un FOS o el polímero levana, liberando el segundo producto que puede ser otra molécula hidrolizada de sacarosa, la síntesis de una nueva molécula de sacarosa, o la síntesis de FOS_{n+1} o levana_{n+1} ($n = \text{residuo de fructosa}$) (Frey y Hegeman, 2007).

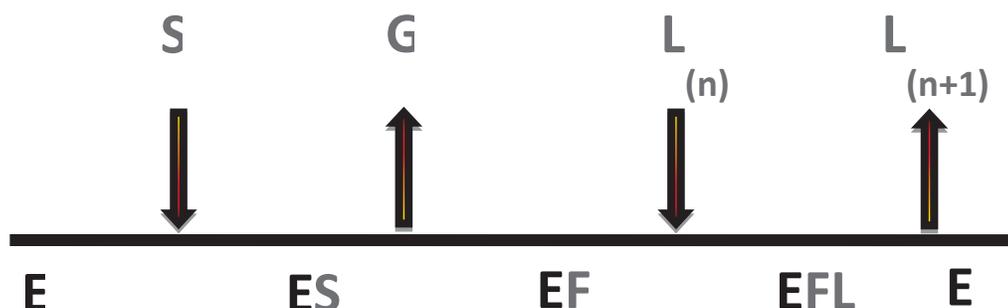


Fig. 6.- Mecanismo de Ping-pong descrito por Chambert *et al*. en 1974 , el cual sigue la levansacarasa, E=enzima, S=sacarosa, G=glucosa, F=fructosa y L=levana

La levansacarasa de *G. diazotrophicus* SRT4 fue cristalizada, mostrando que su estructura es de 5 hojas β -propela. Los motivos considerados como centros catalíticos se encuentran localizados en el centro de esta estructura (fig. 4) donde se lleva a cabo la hidrólisis de la sacarosa para la síntesis de FOS y levanas (Martínez-Fleites *et al*, 2005).

III.9.- Métodos para la producción de levanas

Los métodos de producción de levanas para aplicaciones industriales versa en la síntesis enzimática (Song y Rhee, 1996) y síntesis por fermentación con microorganismos que sintetizan LsdA (Han y Watson, 1992). Es claro que la producción de levanas y su rendimiento está directamente ligado a la concentración de proteína o enzima que se utiliza, donde es posible alcanzar rendimientos de hasta el 84% de conversión de sacarosa a levana, pero es importante señalar que este rendimiento cae hasta en un 30% cuando se utiliza el microorganismo intacto para su síntesis (Abdel-Fattah y col., 2005). Por este motivo ha sido importante encontrar sistemas que sean capaces de reducir los costos de producción de levanas para su uso a nivel industrial. En este sentido, el uso de fermentaciones o sistemas de producción de levanas en continuo ha sido estudiado usando a *Erwiniaherbicola* como el microorganismo productor (Keith et al., 1991) en cuyo trabajo se alcanzaron rendimientos de conversión de sacarosa a levana del 19% (p/p).

Una opción para incrementar los rendimientos en la producción de levanas es el uso de sistemas de inmovilización celular o proteica que disminuye el consumo de materia prima y esté abocada a la síntesis de la levana. Por lo que el presente trabajo estudia las condiciones óptimas de producción del biopolímero levana por *G. diazotrophicus*, mediante la inmovilización enzimática de LsdA producida por esta bacteria para incrementar los procesos de rendimiento de FOS y levanas.

III.9.1.- Métodos para incrementar la síntesis enzimática de levanas

La demanda de las levanas está aumentando, sobre todo por su uso extendido en la industria alimentaria, así como en la industria cosmética y médica, por lo cual se están buscando estrategias para la producción de éstas en mayor escala para hacerla más viable.

Se han probado varios métodos con otras bacterias como *Zimomonasmobillis*, (Song y Rhee 1994), sobre-expresaron la levansacarasa de esta bacteria en *E. coli*, obtuvieron el 40% de la proteína total en el medio de cultivo, esto es 5.2 veces más que la producción de LsdA de la bacteria nativa. Al igual que las levansacarasas de *B. subtilis*, las LsdA de *Z. mobillis* producen principalmente levanas lineales de alto

peso molecular, una ventaja al utilizar *G. diazotrophicus* es que produce en mayor proporción levanas de bajo peso molecular y FOS, así como también levanas de alto peso molecular, aunque en menor proporción que los fructanos anteriormente mencionados. Además, otra ventaja es que las levansacarosas producidas por *G. diazotrophicus* es que constituyen el 70% de las proteínas totales excretadas al medio de cultivo (Menéndez 2004; Hernández et al, 1995), este porcentaje es mucho mayor que en la sobreexpresión de *E. coli*, una desventaja de la producción de levanas y FOS mediante la fermentación de *G. diazotrophicus* son sus largos tiempos de fermentación para producir levanas a comparación de *Z. mobilis* y *B. subtilis*. Sin embargo la síntesis de levanas por las LsdA aisladas, producidas por *G. diazotrophicus* acorta los tiempos de producción y aumenta la eficiencia del sistema. Por lo tanto se están buscando nuevas alternativas para la obtención de LsdA de esta bacteria, uno de estos métodos tuvo por objetivo sobre-expresar la LsdA de *G. diazotrophicus* en *PichiaPastoris*, sin embargo a diferencia de la sobre-expresión de LsdA de *Z. mobilis* en *E. coli*, la de *P. pastoris* no fue muy efectiva, debido a que se obtuvo el 1% de LsdA en proteína total, donde el 81% se encontró en periplasma y el 18 restante en el medio de cultivo, es decir extracelularmente (Trujillo *et al.* 2001), la manipulación genética aún no ha dado resultados efectivos en la producción de LsdA de *G. diazotrophicus*, por lo tanto en este trabajo de investigación se busca incrementar la síntesis de FOS y levanas mediante las LsdA de *G. diazotrophicus* inmovilizadas.

III.9.2.-.-Inmovilización enzimática

La inmovilización de enzimas es un proceso en el que se confina o localiza a la enzima en una región definida del espacio, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica y que pueden ser reutilizadas repetidamente. Posteriormente esta definición se ha ampliado a aquel proceso por el cual se restringen, completa o parcialmente, los grados de libertad de movimiento de enzimas, orgánulos, células, etc. por su unión a un soporte

La inmovilización enzimática permite una mejora significativa en la estabilidad de la proteína, lo que hace posible su empleo en la producción industrial de productos

químicos, farmacéuticos, alimentos; en el tratamiento de residuos; en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades, y otras muchas aplicaciones.

En los últimos años, la biotecnología ha experimentado grandes avances y, paralelamente sus aplicaciones industriales versan en la obtención de productos químicos, en la industria alimentaria y farmacéutica. Los procesos catalizados por enzimas en la industria son cada día más numerosos, ya que presentan una serie de ventajas frente a los catalizadores convencionales no biológicos.

La inmovilización enzimática es muy importante desde el punto de vista comercial, el cual es un método muy importante para facilitar la reutilización de la enzima. Sin embargo, el proceso de inmovilización puede cambiar las propiedades de la enzima libre (Clarke, 1994).

Como ventajas del empleo de enzimas inmovilizadas podemos destacar:

- El aumento de la estabilidad de la enzima
- La posible reutilización del derivado, por lo que disminuyen los costos del proceso.
- La posibilidad de diseñar un reactor enzimático de fácil manejo y control, adaptado a la aplicación de la enzima inmovilizada.

A pesar de estas claras ventajas, el empleo de enzimas no se ha generalizado en los procesos químicos industriales debido a que la mayoría de las enzimas no son estables en las condiciones de trabajo. Por otra parte, al ser solubles en agua, su separación de los sustratos y productos es difícil, y por tanto, no se pueden reutilizar. Con la inmovilización de las enzimas se han podido superar estos últimos inconvenientes, permitiendo que el proceso biotecnológico sea económicamente rentable.

Se ha reportado la inmovilización de LsdA de varias bacterias utilizando diferentes técnicas de inmovilización. Iizuka et al. (1993) reportaron la inmovilización de la levansacarasa de *Bacillus natto* mediante un soporte cerámico, Marx et al. (1999) inmovilizaron levansacarasas de *Zymomonas mobilis* por atrapamiento en perlas de alginato de calcio. Bronshteyn et al. (2002) inmovilizaron la fructosiltransferasa de

Streptococcus mutans en hiroxapatita induciendo la formación de un activo complejo enzimático estable.

III.9.3.- Métodos de inmovilización enzimática

Uno de los métodos de inmovilización más utilizados y de los que se dispone de una mayor información es la unión a soportes. La elección del soporte y del tipo de enlace resultan determinantes en el comportamiento posterior del biocatalizador. Se debe procurar que la inmovilización incremente la afinidad por el sustrato, disminuya la inhibición, amplíe el intervalo de pH óptimo y reduzca las posibles contaminaciones microbianas. Además el soporte debe tener resistencia mecánica adecuada a las condiciones de operación del reactor y ser fácilmente separable del medio líquido para que pueda ser reutilizado. Se han utilizado una gran variedad de materiales como soportes para la inmovilización de numerosas enzimas. Estos materiales difieren en tamaño, densidad, porosidad y forma, aunque generalmente los encontramos en forma de cilindro, hojas, fibras y más corrientemente en forma de esferas. Los soportes pueden clasificarse en dos grandes grupos:

1. **Soportes inorgánicos.** Dentro de este grupo tenemos una gran variedad de soportes, que pueden ser naturales (arcillas como la bentonita, piedra pómez, sílice, etc.) o materiales manufacturados (óxidos de metales y vidrio de tamaño de poro controlado, vidrio no poroso, alúmina, cerámicas, gel de sílice, etc.)

2. **Soportes orgánicos.** Se pueden clasificar en:

Polímeros naturales: a su vez divididos en: polisacáridos (celulosa, almidón, dextranos, agar-agar, agarosa, alginatos, quitina, quitosan, etc.), proteínas fibrosas (colágeno, queratina, etc.).

Polímeros sintéticos: divididos en: Poliolefinas (como el poliestireno)

Polímeros acrílicos (poliacrilatos, poliacrilamidas, polimetacrilatos, etc.)

Otros tipos (alcohol polivinílico, poliamidas, etc.).

IV.- MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1.- Condiciones de cultivo

G. diazotrophicus se mantuvo en medio de agar papa y en medio LGI suplementado con glicerol para su conservación y manejo de cultivos frescos.

Para la producción de levanas se utilizó *G. diazotrophicus* cepa PAI 5, la cual creció en matraces con medio líquido a temperatura de 30°C y a pH inicial de 6 con una agitación constante de 150 rpm. Se utilizó un medio mineral LGI modificado (Arrieta *et al.* 1994; Cavalcante y Döbereiner, 1988): K₂HPO₄, 0.2 g/L; KH₂PO₄, 0.6 g/L; MgSO₄•7H₂O, 0.2 g/L; CaC₁₂•2H₂O, 0.02 g/L; Na₂MoO₄•2H₂O, 0.002 g/L; FeCl₃•6H₂O, 0.01 g/L; solución de azul de bromotimol al 0.5% (p/v) en 5 mL de 0.2N KOH, Triptona 2 g/L; azúcar de caña cristalizada, 100 g/L; glicerol 10%(v/v) y extracto de levadura 0.2 g/L.

Se partió de los cultivos frescos en caja de *G. diazotrophicus*, se inoculó en tubo para la preparación del preinóculo, y de aquí se preparó el inóculo en 500 ml de medio de cultivo con una densidad óptica mínima de 0.2 a 590 nm, el preinóculo e inóculo se incubaron por 72 horas, una vez alcanzado esta etapa al inóculo se le adicionó medio de cultivo sin sacarosa, utilizando el 10% (v/v) de glicerol como principal fuente de carbono. Esta fermentación se mantuvo por 90 h para la posterior adición de medio de cultivo suplementado con sacarosa 10% (p/v) del contenido total, se monitoreó la producción de biomasa hasta 180 h después de adicionar la sacarosa, cuantificando cada 12 horas el crecimiento del cultivo. El procedimiento anterior se describe en la Fig. 7.

IV.2.- Análisis de biomasa

Se realizó una curva de calibración de densidad óptica a 590 nm del cambio en la biomasa de la fermentación de *G. diazotrophicus* contra peso seco en gramos. Esto se realizó partiendo de la toma de 90 horas, haciendo diluciones 1:2, 1:4: 1:8 y 1:32 de esta muestra, midiendo su absorbencia y posteriormente desecando la muestra en un termo block a 80°C hasta llevar a peso constante, para su posterior pesado.

Los datos que se obtuvieron utilizaron para realizar una curva de peso seco contra tiempo.

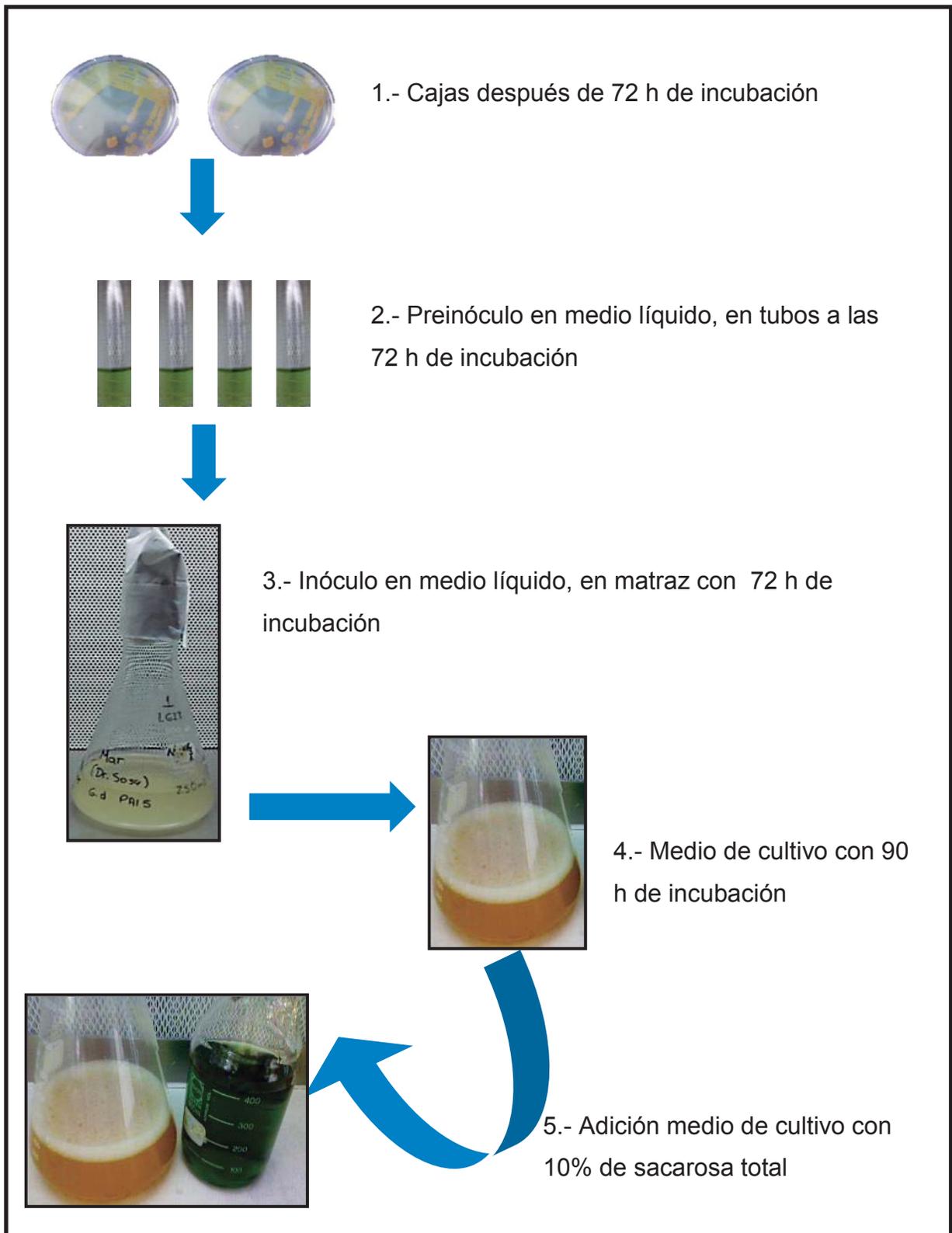


Fig.7- Estrategia experimental para la fermentación de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, partiendo del cultivo en caja para el preinoculo en tubo, para posterior inoculo en matraz y finalmente la adición de sacarosa.

IV.3.- Constantes cinéticas

Para medir las constantes cinéticas se requiere de una ecuación polinomial deducida para cada concentración a estudiar. La ecuación es la siguiente:

$$X = a + bt^1 + ct^2 + dt^3 + et^4 + ft^5 \quad \text{Ecuación 2}$$

Con la ecuación anterior se pueden calcular las siguientes constantes cinéticas:

- Tasa específica de crecimiento: $\mu = \frac{1}{X} \left(\frac{dX}{dt} \right)$ *Ecuación 3*

- Tasa de cambio de sacarosa: $q_s = \frac{1}{X} \left(- \frac{dSac}{dt} \right)$ *Ecuación 4*

- Tasa de cambio de glucosa: $q_G = \frac{1}{X} \left(\frac{dGlu}{dt} \right)$ *Ecuación 5*

- Tasa de cambio de fructosa: $q_F = \frac{1}{X} \frac{dFru}{dt}$ *Ecuación 6*

- Tasa de cambio de FOS: $q_{FOS} = \frac{1}{X} \frac{dFOS}{dt}$ *Ecuación 7*

- Tasa de cambio de levanas: $q_L = \frac{1}{X} \frac{dLev}{dt}$ *Ecuación 8*

- Rendimiento de biomasa con respecto a sacarosa: $Y_{x/s} = \frac{dx/dt}{-ds/dt}$ *Ecuación 9*

- Rendimiento de levanas con respecto a sacarosa: $Y_{L/s} = \frac{dLev/dt}{-ds/dt}$ *Ecuación 10*

- Rendimiento de FOS con respecto a sacarosa: $Y_{FOS/s} = \frac{dFOS/dt}{-ds/dt}$ *Ecuación 11*

IV.4.- Determinación de la concentración de biomasa en matraces

Para los experimentos aquí reportados, la concentración de biomasa se evaluó por medición de absorbencia a 590 nm cada 12 horas. Las lecturas de absorbencia se tradujeron a peso seco (g biomasa/L) utilizando una curva de calibración basada en mediciones gravimétricas de muestras secas de *G. diazotrophicus* cultivado en el mismo medio y condiciones. Los datos derivados de los experimentos de fermentación Batch fueron analizados a fin de caracterizar cinéticamente el proceso y

proponer estrategias para mejorar su desempeño. Para efecto del análisis cinético, se supone válido el modelo general de crecimiento de primer orden (Altiok y col., 2006), que propone que la velocidad de crecimiento de biomasa (r_x) es proporcional a la cantidad de biomasa ($[X]$), a través de la tasa específica de crecimiento (μ):

$$r_x = \frac{d[X]}{dt} = \mu[X] \quad \text{Ecuación 12}$$

Ecuaciones polinomiales de quinto orden fueron ajustadas a los perfiles de biomasa en el tiempo para cada uno de los experimentos por lote.

$$[X] = a + bt + ct^2 + dt^3 + et^4 + ft^5 \quad \text{Ecuación 13}$$

A su vez, estas funciones polinomiales tienen derivadas exactas que son equivalentes, por definición, a la velocidad de producción de biomasa

$$r_x = \frac{d[X]}{dt} = b + ct + dt^2 + et^3 + ft^4 \quad \text{Ecuación 14}$$

$$\mu = \frac{r_x}{[X]} = \frac{1}{[X]} \frac{d[X]}{dt} = \frac{b + ct + dt^2 + et^3 + ft^4}{[a + bt + ct^2 + dt^3 + et^4 + ft^5]} \quad \text{Ecuación 15}$$

IV.5.- Análisis de carbohidratos

Los carbohidratos se analizaron por cromatografía de alta resolución de líquidos (HPLC) VarianProStar con una columna Rezex- RMN- Carbohydrate con un detector de índice de refracción (Perkin Elmer), usando agua como fase móvil, a un flujo de 0.5 mL/min, y a una temperatura de 80 °C. Se utilizó una curva de calibración al 2% de sacarosa, glucosa, fructosa y levanas.

Se determinó el grado de polimerización por medio de una cromatografía de capa fina (TLC), se realizó en silica gel en láminas de TLC de 5 cm y 20 cm de largo. El TLC fue realizado en cámaras de cromatografía en una mezcla de cloroformo / ácido acético / agua (30:35:5, en vol.), corriendo tres veces para las placas de 5 cm y una

vez para las de 20 cm. Se aplicaron varias concentraciones de muestras para determinar la concentración adecuada. Posteriormente las placas se dejaron secar a temperatura ambiente y se revelaron rociándolas con α -naftol al 10% en etanol al 96% y 10% de ácido fosfórico, después de rociarlas se calentaron en una plancha a 120°C por 10 minutos. Los fructanos con un grado de polimerización (DP) de más de 15 no migran y permanecen en el lugar de aplicación.

IV.6.- Inmovilización enzimática

Para la inmovilización de LsdA producidas por *G. diazotrophicus* se siguió la estrategia experimental que sigue:



Fig. 8.- Estrategia experimental que describe los pasos que se siguieron para la inmovilización enzimática

A continuación se describirán los pasos para la inmovilización de LsdA

IV.6.1.- Obtención del medio de cultivo con LsdA

Para la producción de las levansacarosas en el medio, la alimentación con sacarosa se llevó a cabo a las 77 h, por lo cual se monitoreó el crecimiento de la biomasa y la

producción de las levanas con TLC, HPLC y DNS. La obtención del medio de cultivo se partió de 1 litro de medio de cultivo a las 90 horas de incubación de *G. diazotrophicus* donde alcanzó su etapa estacionaria, se adicionó 1 litro de medio LGI adicionado con glicerol y 10% de sacarosa total, se mantuvo en fermentación a 30 °C con agitación constante de 150 rpm, se mantuvo hasta 160 horas después de agregada la sacarosa. Una vez colectado los dos litros de medio de fermentación se procedió a la concentración proteica.

IV.6.2.- Concentración proteica por micro y ultrafiltración

Dos litros de caldo de fermentación se centrifugaron en tubos para centrifuga de 50 mL, a una temperatura de centrifugación de 5000 rpm y 4°C durante 15 minutos. Se recupera el sobrenadante y se decantaron, esto es para remover partículas grandes sobre todo *G. diazotrophicus*.

La microfiltración se realizó con una membrana de polietersulfona (PES) de la marca Sartoriusstedim modelo Vivaflow 200 de 2 µm, el resultado de esta microfiltración se ultrafiltró para concentrar la proteína con una membrana de PES de la marca Sartoriusstedim modelo Vivaflow 200 de 10 000 Da con ayuda de una bomba peristáltica Master Flex.

Las proteínas se cuantificaron con el método de Lowry modificado por Onishi&Barr y Bradford utilizando albumina sérica como estándar, esto se llevó a cabo en todas las etapas a partir de la colección del medio de fermentación.

Se utilizó PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo, del inglés phenylmethylsulfonylfluoride) 0.5 mM como inhibidor de proteasas.

IV.6.3.- Diálisis

Después de la concentración proteica, al extracto obtenido se le realizó una diálisis para desalinizarla. Se utilizaron sacos de diálisis de Sigma-diagnostics, los cuales se limpiaron e hidrataron con ácido benzoico al 0.2%.

Los sacos de diálisis se llenaron con 15 mL del extracto concentrado, se dializó contra acetato de sodio 0.02 M en un volumen total de 1L. El buffer de acetato de

sodio se cambió 4 veces, 3 cada 4 horas y el último cambio de buffer se efectuó a las 12 horas.

IV.6.4.-Inmovilización enzimática

La inmovilización se hizo mediante atrapamiento físico en geles de agarosa al 1% (p/v) con la técnica de Esawy *et al.* (2008), y agar al 2, 3 y 4% (p/v) se mezclaron 2 mL de extracto enzimático con 20 mL de agar o agarosa a las concentraciones antes mencionadas y 2 mL de solución de sacarosa 0.5 M. El extracto enzimático con agarosa se dejó solidificar y después se cortó en cubos pequeños. A las soluciones con agar se les dejó gotear en aceite estéril de girasol frío para formar perlas, se lavaron con abundante agua para remover la fase de aceite. Las perlas limpias se suspendieron en buffer de acetato al (0,2 M, pH 5.2), para su posterior uso.

IV.6.5.-Determinación de actividad enzimática

La actividad de la levansacarasa fue determinada cada 6 min hasta 18 min usando 0.25 M de sacarosa en buffer de acetato de sodio 0.1 M, a pH 5.2 a 40°C (Hernández *et al.*, 2000). La actividad de la levansacarasa fue cuantificada con la medición de la glucosa liberada acoplada a un ensayo enzimático de reducción de NAD⁺. La sacarosa se hidrolizó con la levansacarasa y la glucosa liberada se fosforiló con una hexocinasa, los productos fosforilados en presencia de NAD⁺ se oxidaron con la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Durante la oxidación, una cantidad equimolar de NAD⁺ es reducido a NADH, con el consecuente incremento de la absorbancia a 340 nm, este incremento es directamente proporcional a la concentración de glucosa. La concentración de glucosa también se determinó cuantitativamente mediante cromatografía de alta resolución de líquidos (HPLC) y se midieron los azúcares reductores con DNS (Ácido dinitrosalicílico), con glucosa, sacarosa, fructosa e inulina como estándares. La formación de FOS y levanas se determinó cualitativamente mediante cromatografía de capa fina (TLC). Una unidad de Levansacarasa es definida como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de glucosa por minuto bajo las condiciones de reacción analizadas. Las proteínas fueron cuantificadas por el método de Bradford (1976) usando albúmina de suero bovino como estándar.

V. HIPÓTESIS

El uso de un proceso de inmovilización enzimática incrementa el rendimiento en la producción de levanas de bajo peso molecular por *G. diazotrophicus* en sistemas de producción continuos.

VI. OBJETIVOS

VI.1.- General

Implementar un proceso continuo para la producción de levanas por medio de inmovilización enzimática de la levansacarasa de *G. diazotrophicus*.

VI.2.- Específicos

1. Caracterizar la cinética de fermentación de *G. diazotrophicus*, para la producción de levanas.
2. Estandarizar el método de inmovilización proteico para la síntesis de levanas.
3. Determinar la eficiencia global y el rendimiento del proceso de producción en continuo de levanas.

VII.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VII.1- Curva de crecimiento

En la Fig. 7 se muestra el crecimiento que presenta *G. diazotrophicus* hasta las 90 horas, en este punto no hay adición de sacarosa, por lo que la bacteria utiliza principalmente glicerol como sustrato. En la Fig. 9 podemos apreciar que se presenta un crecimiento exponencial después de las 10 horas, su fase estacionaria se presenta aproximadamente a las 70 horas de incubación, alcanzando una absorbencia máxima de 1.68 UA₅₉₀.

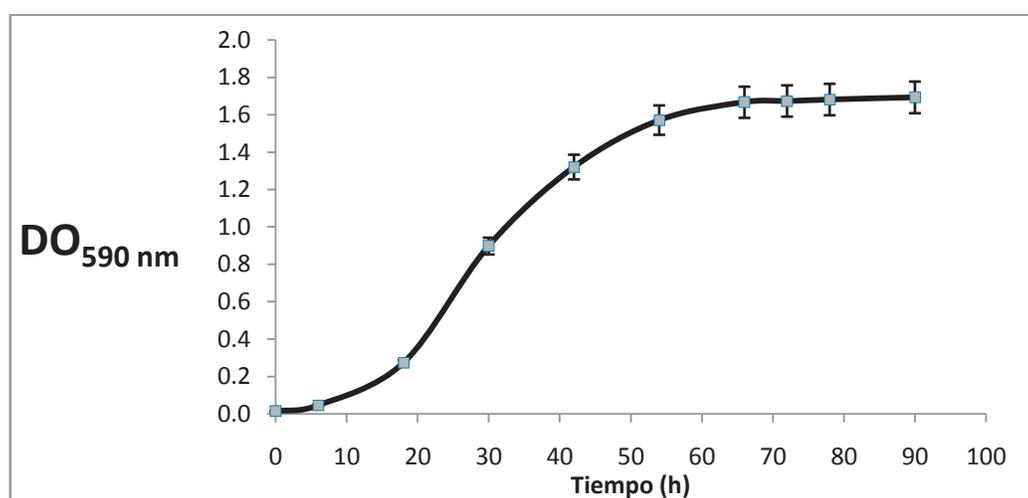


Fig. 9.- Curva de crecimiento de *G. diazotrophicus* expresado en densidad óptica vs tiempo, hasta las 90 horas, se muestran las barras de errores de porcentaje para la absorbencia.

Se realizó una curva de calibración de peso seco contra absorbencia y los datos se muestran en el apéndice 1 en la Fig. A1 y ecuación a1. En base a lo anterior se pudo calcular la relación directa entre el peso seco y el tiempo que se muestra en la Fig. 8. Esta curva de crecimiento sigue una tendencia polinómica de orden 3 como la mostrada en la ecuación 2. El factor de correlación de esta curva polinómica es de 0.9871. Lo cual nos indica que los datos experimentales se comportan de una manera muy exacta a la línea de tendencia. Los puntos grises corresponden a los puntos experimentales y la curva negra corresponde a la línea de tendencia descrita por la ecuación presentada abajo de la Fig. 10a, el b) corresponde a la gráfica de biomasa cuando se le adiciona sacarosa después de las 77 horas de crecimiento con

glicerol. Para fines cinéticos se obtuvieron las dos ecuaciones que describen las tendencias de ambas curvas de crecimiento (ecuaciones 16 y 17).

En la Fig. 8a se aprecia que la fase exponencial de crecimiento con glicerol se alcanza en las primeras horas y se prolonga hasta las 20 h, siendo a partir de las 60 cuando inicia la fase estacionaria. Entre las 80 y 100 h el cambio es insignificante, lo cual significa que se alcanza la etapa estacionaria, no podemos apreciar la etapa de muerte debido a que no se hicieron estudios de viabilidad.

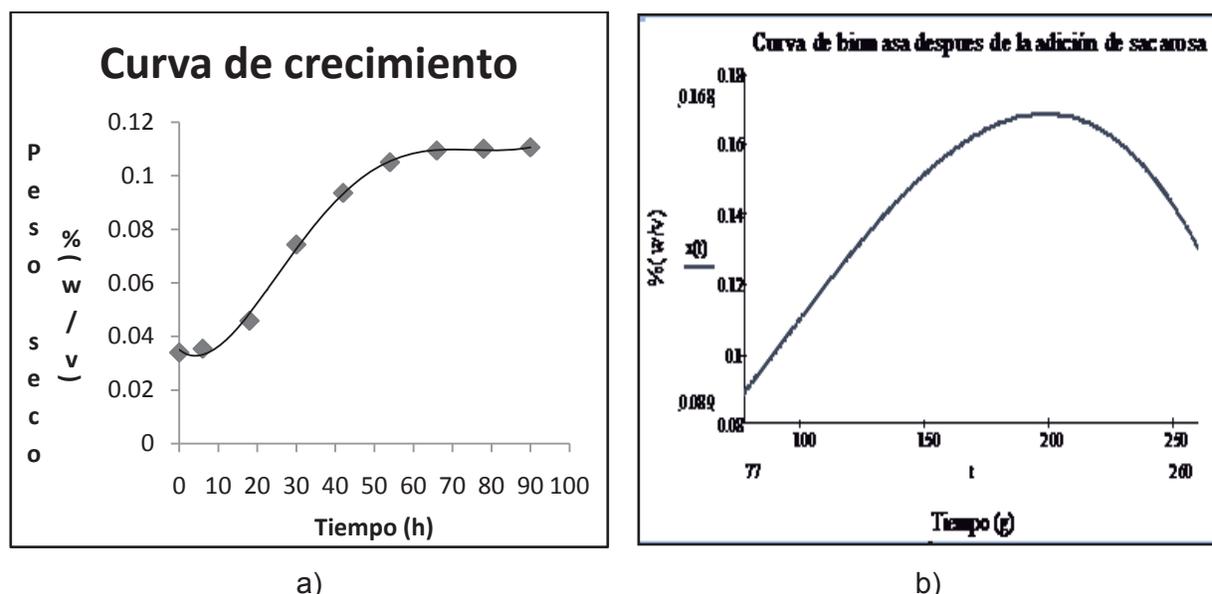


Fig.10.- a) Curva de crecimiento de tiempo contra % peso seco de la fermentación de *Gluconacetobacter diazotrophicus* con glicerol como sustrato, b) curva de crecimiento de tiempo contra % peso seco de la fermentación de *Gluconacetobacter diazotrophicus* con sacarosa como sustrato

$$y = 9.76 \times 10^{-9} t^4 - 1.97 \times 10^{-6} t^3 + 1.16 \times 10^{-4} t^2 - 7.12 \times 10^{-4} t + 3.44 \times 10^{-2} \quad \text{Ecuación 16}$$

$$y_{\text{Sacarosa}} = -2.61 \times 10^{-8} t^3 + 6.93 \times 10^{-6} t^2 + 3.23 \times 10^{-4} t + 3.46 \times 10^{-2} \quad \text{Ecuación 17}$$

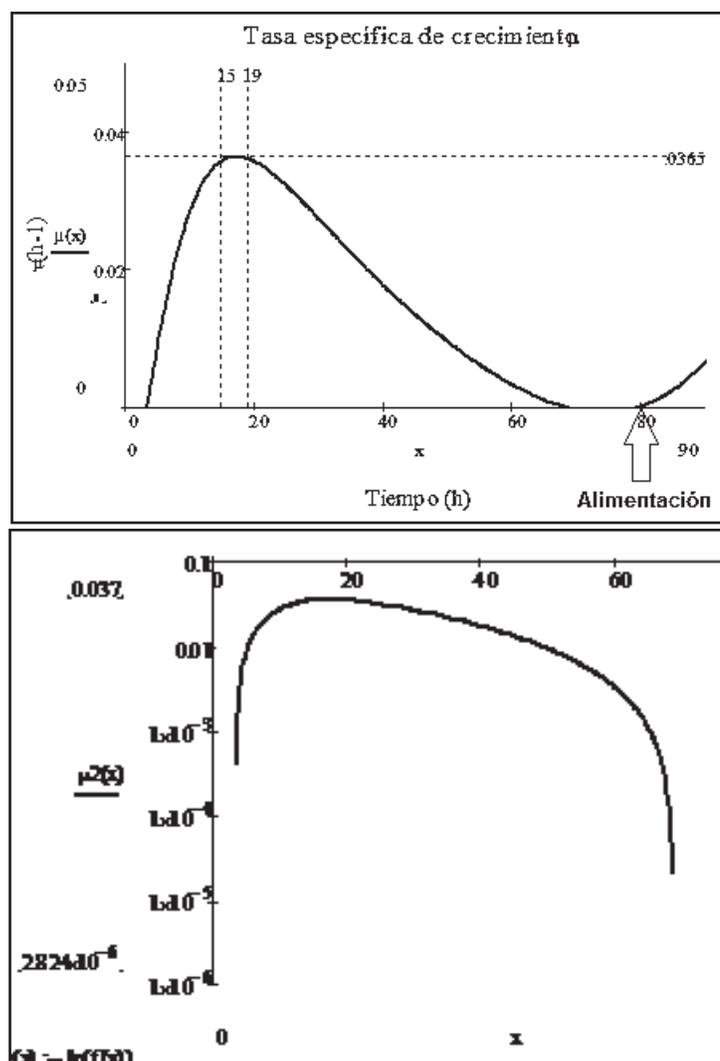
Tejera y col en 2004, cultivaron la cepa PAI 5 variando el medio mineral (LGIM), el cual a diferencia del utilizado en este estudio (LGIE), no está suplementado con glicerol y el crecimiento de *G. diazotrophicus* no superó densidades ópticas de 1.6 hasta 144 horas, lo cual nos indica que nuestro medio es más adecuado para el crecimiento de esta cepa. En el presente estudio, a las 90 horas de crecimiento la

cepa superó el crecimiento de 1.6, lo cual nos hace sugerir que el glicerol contenido en el medio ayuda al crecimiento de *G. diazotrophicus*.

VII.2.- Tasa específica de crecimiento

La tasa específica de crecimiento se calculó de dos maneras, utilizando glicerol (Fig. 11) y sacarosa (Fig. 12) como sustratos. El glicerol se utilizó en los inóculos pues es la mejor alternativa para el desarrollo de *G. diazotrophicus*. La sacarosa se adicionó con el fin de sintetizar levanas, cuando *G. diazotrophicus* alcanzó la etapa estacionaria.

La velocidad máxima de crecimiento (μ_{max}) con glicerol, de *G. diazotrophicus* se alcanzó entre las 15 y 19 horas, con valores de 0.0365 h^{-1} .



a)

$$\mu = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt}$$

Ecuación 3

b)

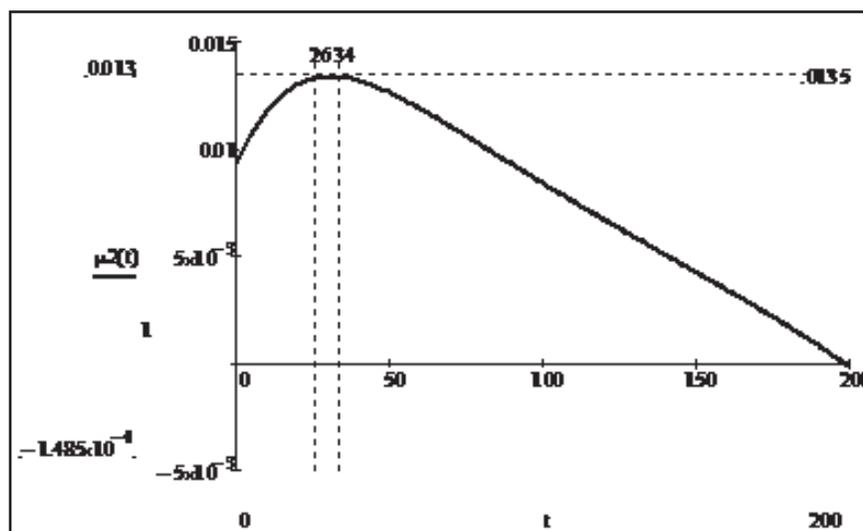
$$\mu_2 = \frac{d \ln x}{dt}$$

Ecuación 18

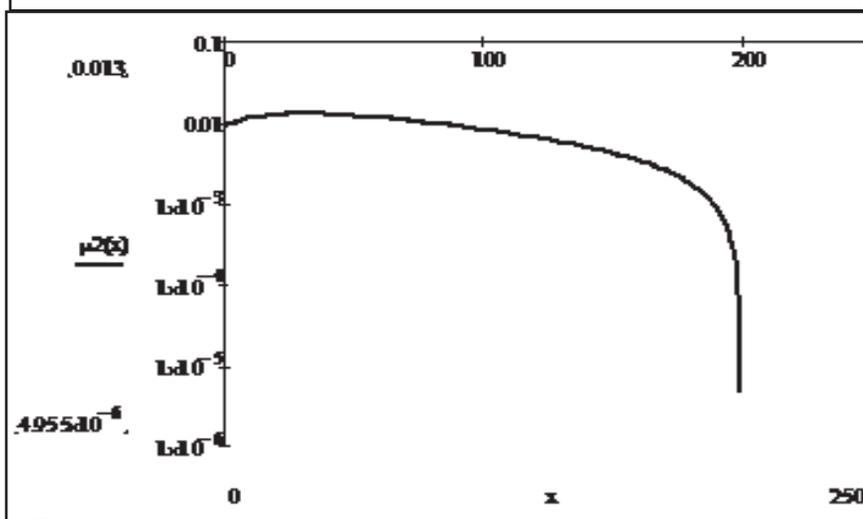
Fig. 11.- a) Tasa específica de crecimiento con glicerol como sustrato, b) tasa específica de crecimiento expresada como la derivada del logaritmo de la biomasa vs tiempo

En la Fig. 11b, se muestra una tasa de crecimiento realizada por la derivada del logaritmo natural de la ecuación de biomasa contra el tiempo. En esta figura se pueden apreciar más claramente las etapas de crecimiento, se muestra que el crecimiento máximo se alcanza entre las 12 y 20 h, siendo un rango que concuerda con la fig. 9 a)

En la Fig. 12 se muestra la tasa específica de crecimiento después de 90 horas al agregar sacarosa. Las Fig. 12a y 12b se realizaron con las ecuaciones 17 y 18 respectivamente pero sustituyendo la ecuación de biomasa con glicerol por la de biomasa con sacarosa (ecuación 17). La velocidad máxima de crecimiento (μ_{max}) de *G. diazotrophicus* se alcanzó dentro de las 26 a 34 horas, con valores de 0.0135 h^{-1} .



a)



b)

Fig. 12.- a) Tasa específica de crecimiento con sacarosa, b) b) tasa específica de crecimiento expresada como la derivada del logaritmo de la biomasa vs tiempo

En la Fig. 9b, se muestra una tasa de crecimiento realizada por la derivada del logaritmo natural de la ecuación de biomasa con sacarosa contra el tiempo, esta Fig.nos indica que la etapa máxima de crecimiento se mantiene durante más tiempo.

VII.3.- Análisis por HPLC

Después de que el cultivo fue llevado a fase estacionaria, se adicionó medio LGIE al doble de su proporción con una concentración inicial de sacarosa del 10 % aproximadamente. Del muestreo obtenido cada 12 horas se seleccionaron 3 muestras que describen el comportamiento general de la fermentación y se analizaron mediante HPLC obteniendo los resultados mostrados en la tabla 1.

Tiempo (h)	% Peso / volumen (w/v)				
	Sacarosa	FOS	Levanas	Glucosa	Fructosa
77	10.73	0.0004	0	0.72	0.55
149	6.03	3.946	1.101	0.46	2.57
237	3.436	6.389	4.759	0.97	4.73

Tabla 1.- Resultados del HPLC. Experimento 1

La curva verde en la Fig. 11 se refiere a un tiempo de incubación de 237 h, la rosa a 149 y la azul a 77 horas o 160, 72 y 0 a partir de agregada la sacarosa, cabe mencionar que a las 77 horas se agregó sacarosa al medio de cultivo. Los resultados están expresados en porcentaje peso/ volumen (%w/v), las muestras están diluidas 1:10 para todos los cromatogramas aquí mostrados (fig. 13,14 y 15).

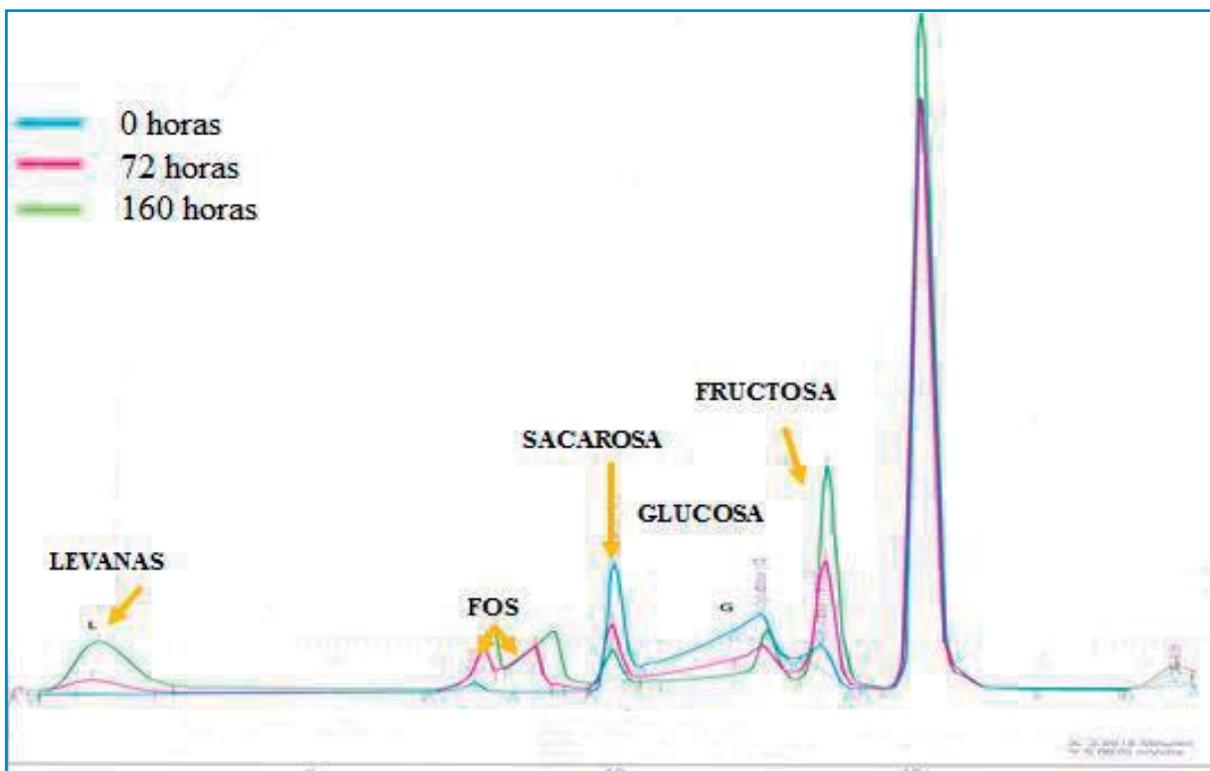


Fig. 13.- Cromatograma de estudio realizado mediante HPLC experimento 1

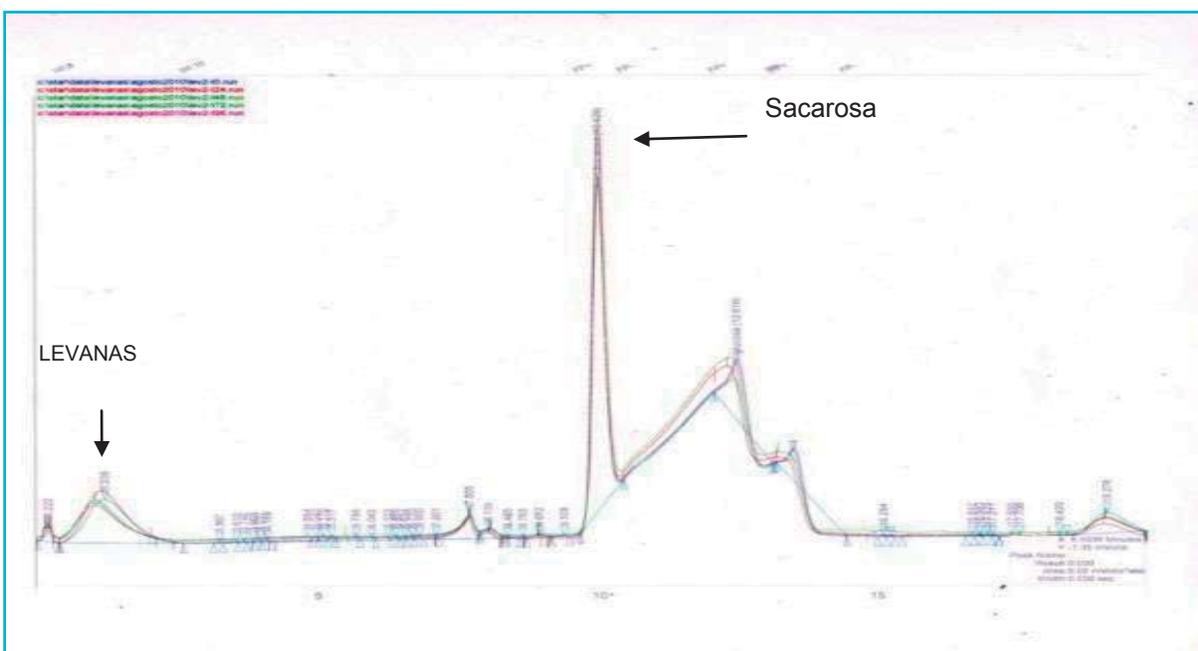


Fig. 14.- Cromatograma de estudio realizado mediante HPLC experimento 2

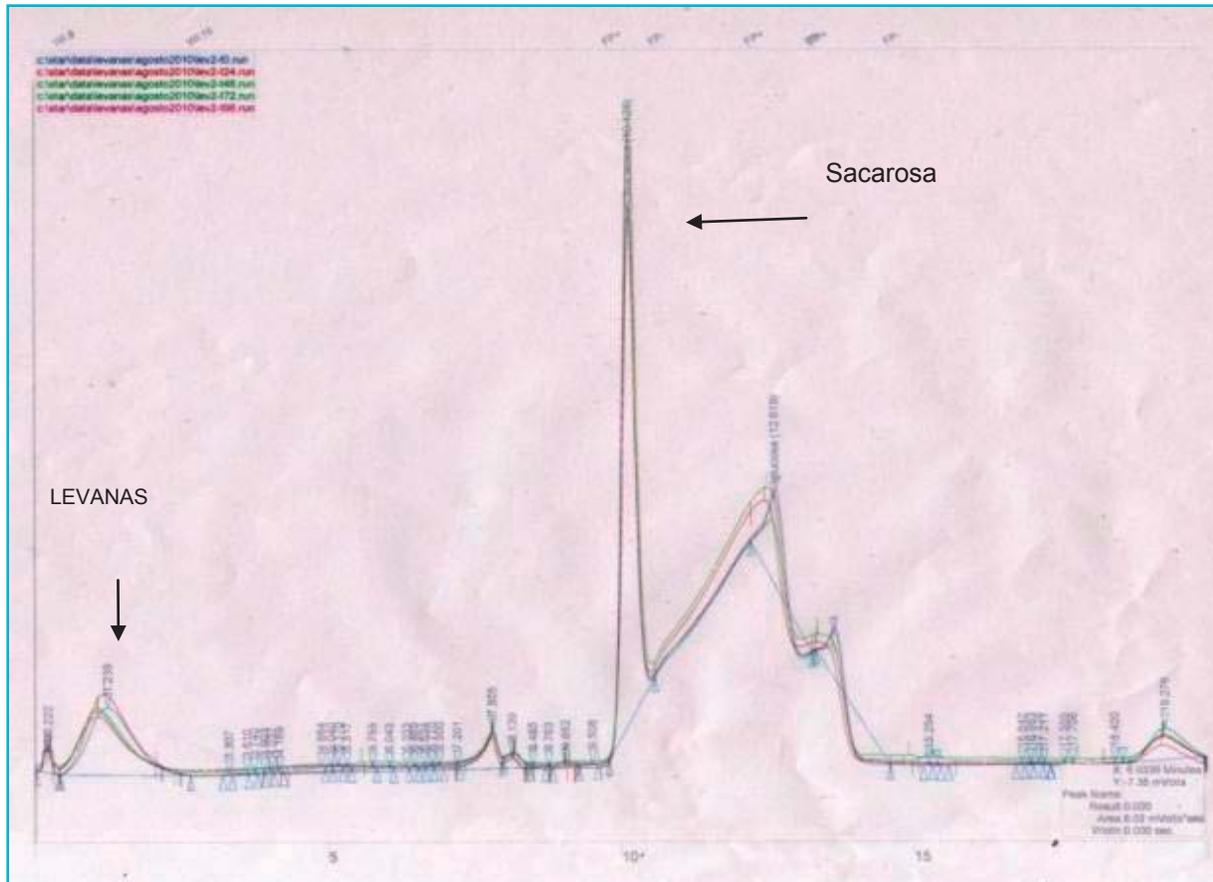


Fig. 15.- Cromatograma de estudio realizado mediante HPLC experimento 3

Experimento	
1	Se utilizó 10% de glicerol como sustrato en el inóculo y al adicionar sacarosa no se lavó el caldo de cultivo
2	Se utilizó 10% de glicerol como sustrato en el inóculo y al adicionar sacarosa se lavó el caldo de cultivo mediante una centrifugación
3	Se utilizó 1% de glucosa como sustrato en el inóculo y al adicionar sacarosa no se lavó el caldo de cultivo

Tabla 2.- Experimentos mostrados en los cromatogramas

En los experimentos 2 y 3 mostrados en las fig. 14 y 15 la diferencia fue la remoción del glicerol al adicionar la sacarosa, en la fig. 13 aparece un pico muy grande de glicerol, pero al removerlo en los siguientes experimentos desapareció. Para el cálculo de los parámetros cinéticos se utilizó los datos del primer experimento (tabla 1) debido a que la presencia de glicerol en el medio favorece la síntesis de levanas y esto se observó en la cantidad final presente de este fructano.

Se determinó la curva de tendencia con la que se calcularon los parámetros cinéticos en el programa matemático mathcad 14, se determinó la curva de tendencia que describe el comportamiento de consumo de sacarosa (Fig. 16), que está regida por la ecuación 19.

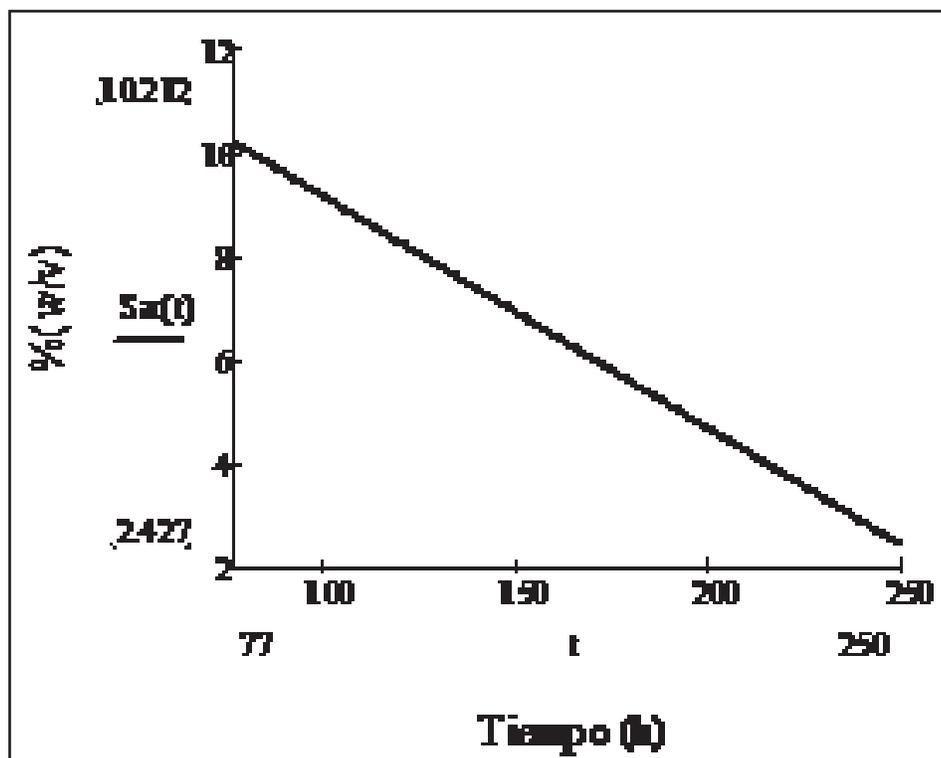


Fig. 16- Línea de tendencia de consumo de sacarosa en % peso/volumen (w/v) vs tiempo, de la fermentación de *Gluconacetobacter diazotrophicus* utilizando sacarosa como sustrato

$$Sac(t) = -0.045t + 13.677 \text{ Ecuación 19}$$

VII.4.- Curvas de producción de carbohidratos

Para graficar el comportamiento de la biomasa desde 0 hasta pasadas 230 horas de incubación, se realizó la suma de 2 ecuaciones de tendencia, de 0 a 90 h y de 80 a 237h (fig.15). Para el cálculo de los parámetros cinéticos después de agregar la sacarosa solo se consideró la ecuación pasada las 77 h (ecuación 17).

$$y_{Sacarosa} = -2.61 \times 10^{-8} t^3 + 6.93 \times 10^{-6} t^2 + 3.23 \times 10^{-4} t + 3.46 \times 10^{-2} \text{ Ecuación 17}$$

En las Fig. 17 se aprecian las curvas de producción de Fructooligosacaridos (FOS) y levanas, además de glucosa y fructosa (Fig. 17).

En el eje de las “y” se muestran las cantidades de glucosa y fructosa en % peso/volumen, en el caso de la fig. 18 y 19.

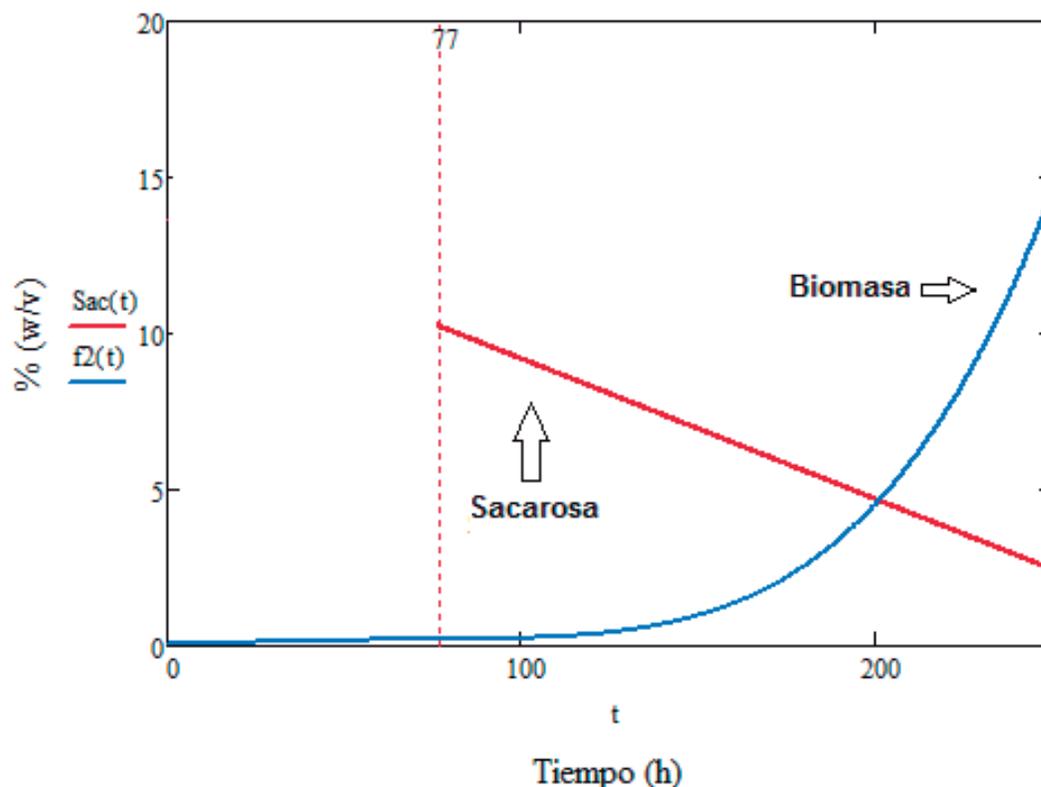


Fig. 17.- Curva de producción de biomasa(línea azul) y consumo de sustrato(línea roja) vs tiempo de la fermentación con sacarosa como fuente de carbono

En el gráfico de producción de fructanos (Fig. 18) se aprecia que en las primeras etapas del proceso se produce mayor cantidad de FOS, y posteriormente las levaduras van incrementando su síntesis, aunque en las etapas estudiadas aún no se muestra decremento en los FOS, esto es concomitante con lo que mencionan Hernández *et al.* (1999), a diferencia de *Bacillus subtilis*, *G. diazotrophicus* no utiliza 1-kestosa y kestotetrosa como principales aceptores para la síntesis de levaduras, aunque se identificaron como FOS en general no identificamos el tipo específico de FOS pero lo más probable es que sean del tipo antes mencionado.

En cuanto a la glucosa y fructosa (Fig.19), se ve que hay mayor producción de fructosa a diferencia de la glucosa, se observa que el microorganismo tiene afinidad

por la glucosa y es por esto que hay disminución en los niveles de glucosa, más adelante se analizará con mayor detalle este valor en las curvas respectivas. La acumulación tanto de glucosa como de fructosa se deben a la actividad de hidrólisis de sacarosa de LsdA producida por *G. diazotrophicus*.

En base a las Fig. 17, 18 y 19 se obtuvieron las ecuaciones que describen el comportamiento de cada uno de los carbohidratos, para levanas (ecuación 20), FOS (ecuación 21), Glucosa (ecuación 22) y fructosa (ecuación 23).

$$Lev(t) = 0.0002t^2 - 0.0218t + 0.7072 \quad \text{Ecuación 20}$$

$$FOS(t) = -0.0002t^2 + 0.093t - 61597 \quad \text{Ecuación 21}$$

$$Glu(t) = 5.879 \times 10^{-5}t^2 - 1.69 \times 10^{-2}t + 1.673 \quad \text{Ecuación 22}$$

$$Fru(t) = 0.026t - 1.4064 \quad \text{Ecuación 23}$$

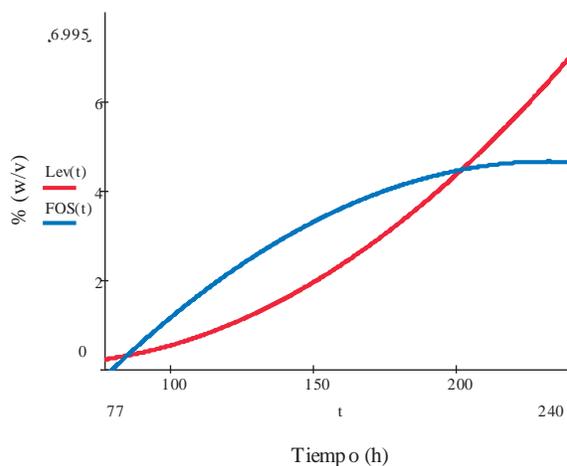


Fig. 18.- Producción de fructanos de *G. diazotrophicus* utilizando sacarosa como sustrato

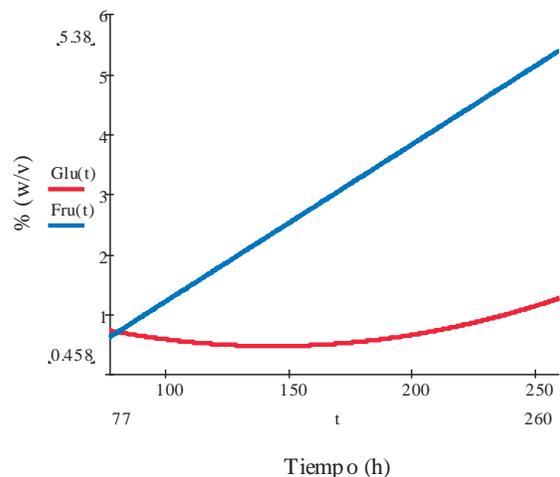


Fig. 19.- Cambio de fructosa y glucosa en la fermentación de *G. diazotrophicus*, utilizando sacarosa como sustrato

VII.5.- Parámetros cinéticos

Se calcularon los parámetros cinéticos de los carbohidratos involucrados en el proceso, a continuación se muestran las tasas de cambio y los rendimientos.

VII.6.-Tasa de cambio de sacarosa

La tasa de cambio de sacarosa describe el cambio de la sacarosa a través del tiempo con respecto a la ecuación de la biomasa, se requirió de la ecuación 19 que describe el cambio de la sacarosa a través del tiempo y de la ecuación del comportamiento de la biomasa una vez adicionada la sacarosa (ecuación 17). Con las dos ecuaciones antes mencionadas haciendo el respectivo trabajo matemático en matcad se obtuvo la ecuación 24, que se muestra graficada en la Fig. 20.

$$q_{Sac}(t) = \left(\frac{1}{f(t)}\right) \left(-\frac{d}{dt} Sac(t)\right) \rightarrow \frac{0.045}{-2.6e^{-8}t^3 + 0.00000693t^2 + 0.000323t + 0.0346} \quad \text{Ecuación 24}$$

La tasa de cambio de sacarosa la rige directamente la acumulación de biomasa, por lo que al ser inversa, la tasa va disminuyendo y no se refleja marcadamente el cambio de la sacarosa. Es decir, que la tasa de cambio se rige por el comportamiento de la biomasa entre más crecimiento hay, más cambio hay en la sacarosa.

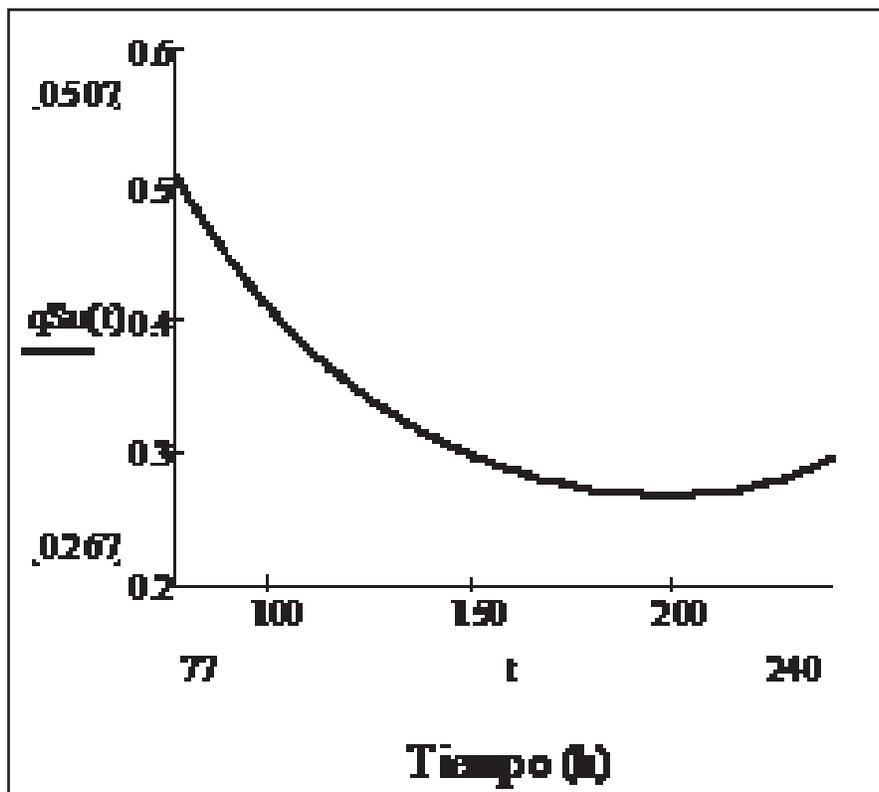


Fig. 20.- Curva representativa de la tasa de cambio de sacarosa con respecto al tiempo

VII.7.-Tasa de cambio de glucosa y fructosa

Al igual que la tasa de cambio de sacarosa, la tasa de cambio de glucosa y fructosa se graficaron mediante la ecuación de biomasa (ecuación 17) y el cambio de la glucosa (ecuación 22) o fructosa (ecuación 23) a través del tiempo.

El resultado del análisis matemático se encuentra en la ecuación 25 para la glucosa y la ecuación 26 para la fructosa. En base a estas ecuaciones podemos graficar las tasas de cambio, descritas en la Fig. 21, el eje de las x se refiere al tiempo en horas y el eje de las “y” a la tasa de cambio de la glucosa a) y la tasa de cambio de fructosa b)

$$qG(t) = \left(\frac{1}{f(t)}\right) \left(\frac{d}{dt} Glu(t)\right) \rightarrow \frac{0.00011758t - 0.0169}{-2.6e^{-8t^3} + 0.00000693t^2 + 0.000323t + 0.0346} \quad \text{Ecuación 25}$$

$$qFru(t) = \left(\frac{1}{f(t)}\right) \left(\frac{d}{dt} Fru(t)\right) \rightarrow \frac{0.0261}{-2.6e^{-8t^3} + 0.00000693t^2 + 0.000323t + 0.0346} \quad \text{Ecuación 26}$$

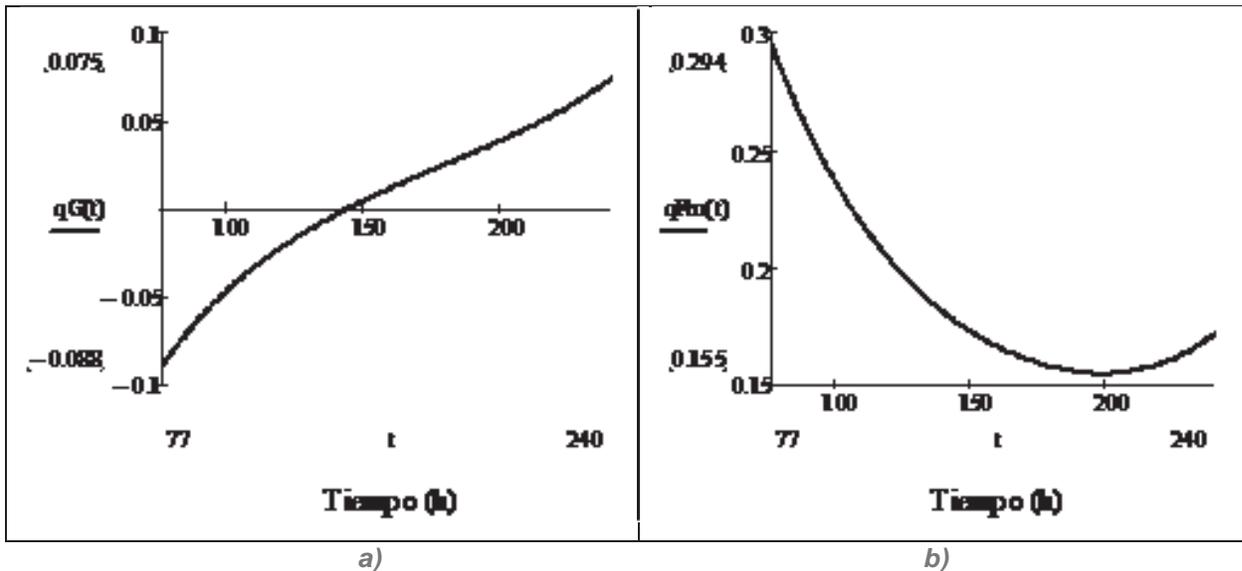


Fig. 21.- Tasa de cambio de glucosa (qG(t) a) y fructosa (qFru(t) b) vs tiempo

En la fig. 22 se aprecia la comparación de las tasas de cambio de sacarosa (rojo), glucosa (azul) y fructosa (verde), las tasas de cambio de fructosa y sacarosa son relativamente parecidas, esto es porque en la sacarosa hay una disminución proporcional a la suma del cambio de la glucosa y fructosa.

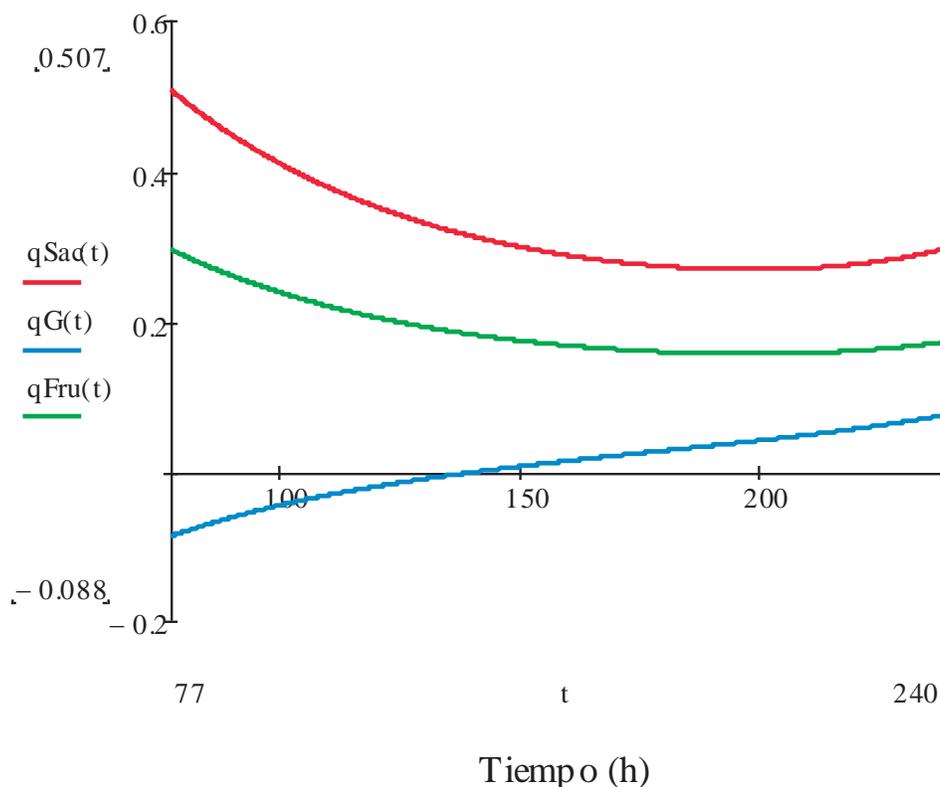


Fig. 22.- Grafica comparativa de las tasas de producción de los carbohidratos involucrados en la fermentación de *G. diazotrophicus*

VII.8.-Tasa de cambio fructanos

Mediante la ecuación de biomasa previamente descrita en los anteriores apartados se calcularon las tasas de cambio de levanas en rojo (q_{Lev}) y de FOS en azul (q_{FOS}) fig. 23, que son descritas por las ecuaciones 27 y 28 respectivamente.

$$q_{Lev}(t) = \left(\frac{1}{f(t)}\right) \left(\frac{d}{dt} Lev(t)\right) \rightarrow \frac{0.0004t - 0.0218}{-2.6e^{-8t^3} + 0.00000693t^2 + 0.000323t + 0.0346} \quad \text{Ecuación 27}$$

$$q_{FOS}(t) = \left(\frac{1}{f(t)}\right) \left(\frac{d}{dt} FOS(t)\right) \rightarrow \frac{-0.0004t + 0.093}{-2.6e^{-8t^3} + 0.00000693t^2 + 0.000323t + 0.0346} \quad \text{Ecuación 28}$$

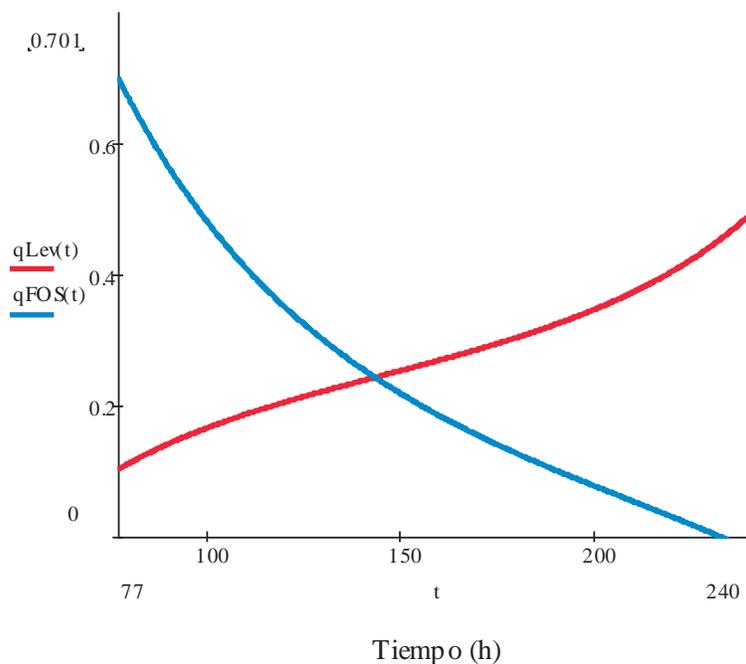


Fig. 23.- Curvas que describen las tasas de cambio de levanas ($q_{Lev}(t)$) curva roja y tasa de cambio de FOS ($q_{FOS}(t)$) curva azul

Se puede apreciar en la Fig. 23 que ambos fructanos tienen comportamientos opuestos con respecto a sus cambios, mientras el cambio en los FOS es más eficiente en la etapa inicial, el cambio en las levanas se vuelve mayor en las últimas fases de crecimiento de *G. diazotrophicus*.

VII.9.- Rendimiento de fructanos con respecto a sacarosa

Se determinó el rendimiento de los FOS y de las levanas con respecto a la sacarosa, esto se hizo mediante la derivada o el cambio en las levanas (ecuación 20) y la derivada o el cambio en los FOS (ecuación 21), con respecto a la derivada o el cambio de la sacarosa (ecuación 19). En base a las ecuaciones previamente descritas podemos expresar el rendimiento de levanas con respecto a la sacarosa en la ecuación 29 y el rendimiento de FOS con respecto a sacarosa (ecuación 30).

Las ecuaciones 29 y 30 se muestran graficados en la Fig. 24, el cambio de los FOS a medida que pasa el tiempo va disminuyendo, esto indica que los FOS cuando más cambio tienen es en las primeras etapas del proceso, pero después las levanas cambian más. Es decir, que el mayor cambio se observa en las últimas etapas a

medida que va pasando el tiempo y estos cambios se traducen en acumulación de la levana y consumo del FOS.

$$Y_{Lev}(t) = \frac{\left(\frac{d}{dt} Lev(t)\right)}{-\left(\frac{d}{dt} Sac(t)\right)} \rightarrow 0.00889 - 0.4844 \quad \text{Ecuación 29}$$

$$Y_{FOS}(t) = \frac{\left(\frac{d}{dt} FOS(t)\right)}{-\left(\frac{d}{dt} Sac(t)\right)} \rightarrow 0.00889 - 2.0667 \quad \text{Ecuación 30}$$

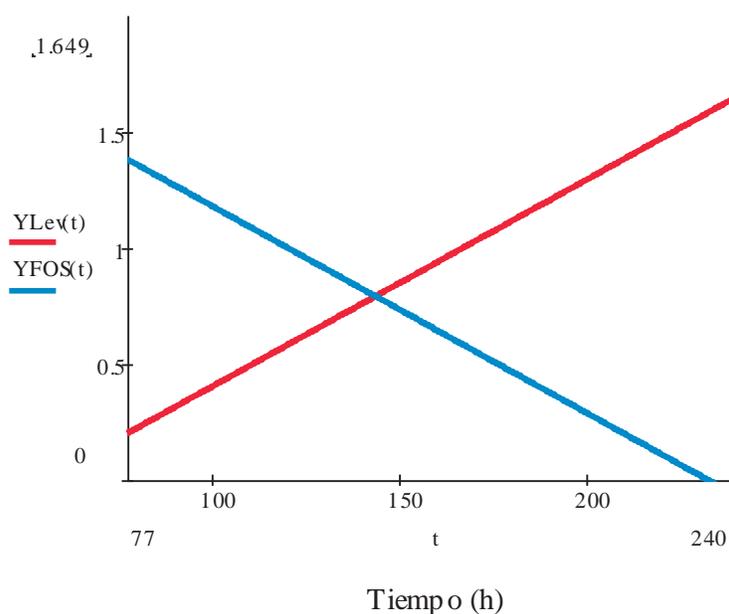


Fig. 24.- Curva que describe el rendimiento de fructanos de la síntesis de la fermentación de *G. diazotrophicus* con respecto a sacarosa

VII.10.-Rendimiento de biomasa

Para calcular el rendimiento de la biomasa (representado como $x(t)$) con respecto a sacarosa ($Sac(t)$) se utilizaron las ecuaciones de cambio de biomasa a partir de la adición de la sacarosa, al derivarlas da como resultado la ecuación 31, que describe la Fig.25.

$$Y_{Sac}(t) = \frac{\left(\frac{d}{dt}x(t)\right)}{\left(\frac{d}{dt} - Sac(t)\right)} \rightarrow 0.000308t - 0.00000173t^2 + 0.007178 \quad \text{Ecuación 31}$$

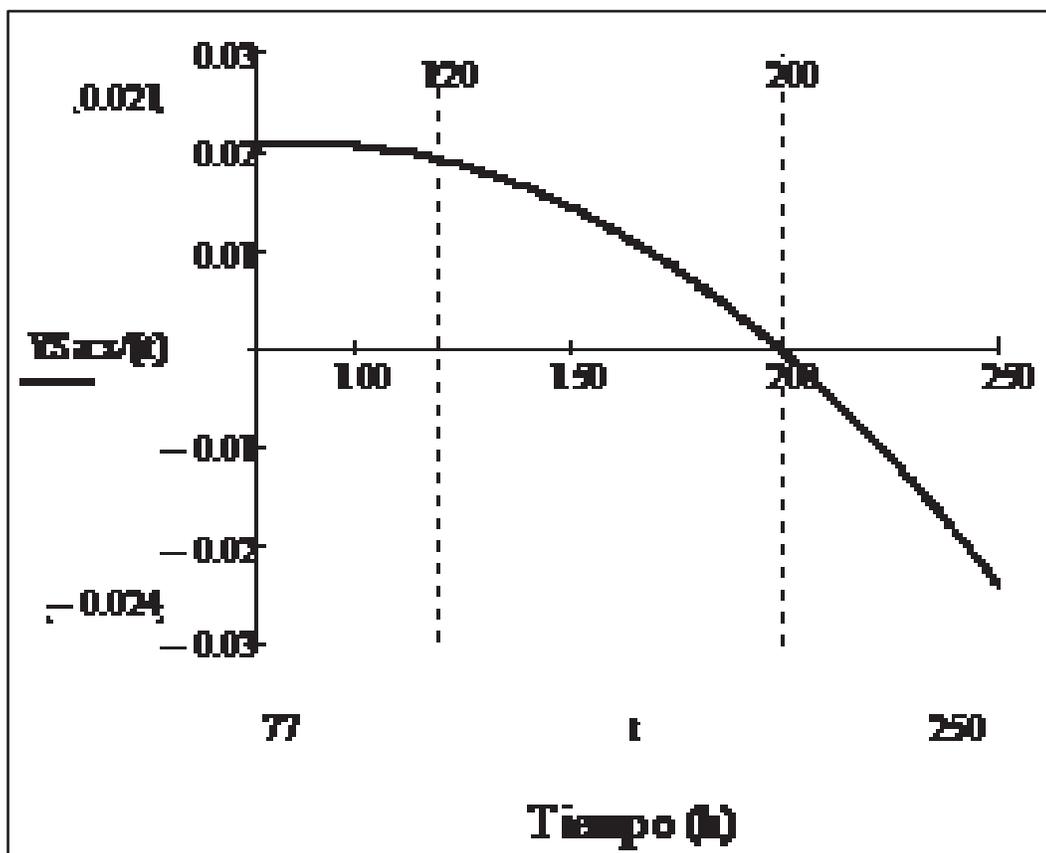


Fig. 25.- Curva que describe el rendimiento de biomasa con respecto a la sacarosa

En la fig. 25 se observa que al inicio del proceso el cambio de la biomasa es igual al cambio de la sacarosa, después de las 100 h se observa que el cambio en la sacarosa va aumentando, menor cantidad de biomasa es necesaria para un mayor cambio en la sacarosa.

VII.11.- Análisis por cromatografía de capa fina (TLC)

En la Fig. 26 se muestra unas placas de 5 cm donde se cargó muestra a diferentes tiempos de fermentación una vez adicionada la sacarosa, los tiempos de fermentación se indican en la parte de abajo de las placas.

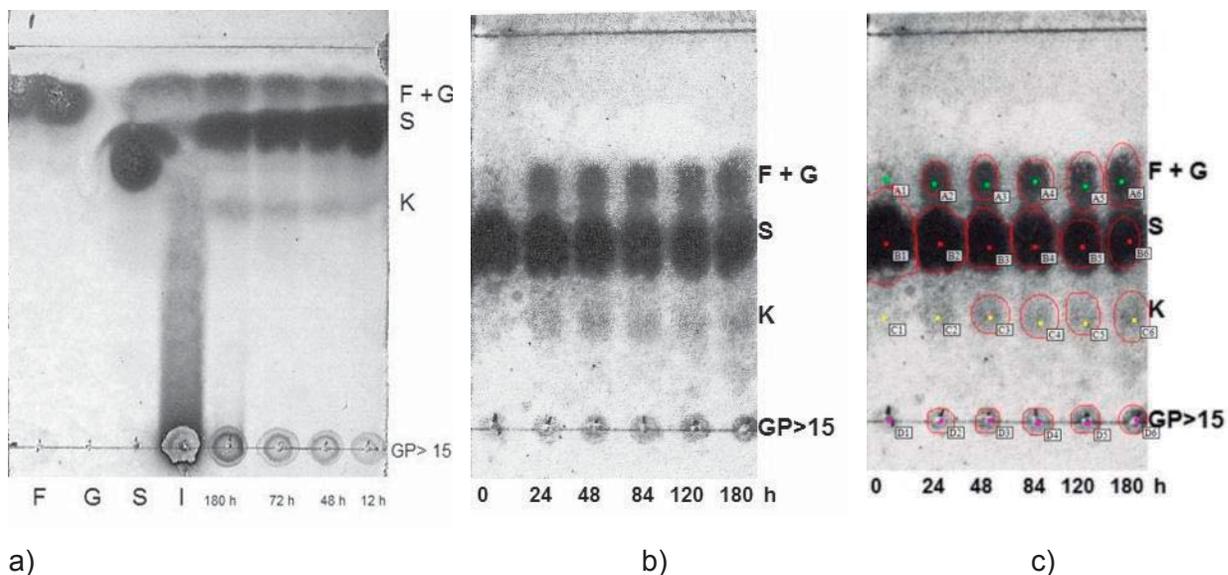


Fig. 26.- Placas de cromatografía de placa fina de 5 cm de largo. F=fructosa, G=glucosa, K=kestosa, GP=grado de polimerización, S=sacarosa, I=inulina, a) análisis con controles, b) análisis a diversos tiempos de fermentación y c) análisis de manchas encontradas.

La Fig. 26c es un análisis de la ubicación y volumen de manchas realizado con el programa "Just TLC" versión 3.5. Gracias a este podemos comparar las manchas encontradas en cada carril, en Fig. 26a no se realizó el análisis debido a que las manchas no se encuentran bien definidas.

En la Fig. 27 se detectó que en el primer carril u hora 0, solo se encuentra una mancha de sacarosa que también es la mancha de sacarosa de mayor volumen en comparación con los demás carriles. A las 24 h ya se encuentra una pequeña cantidad de levanas, la sacarosa sigue presente, además se detecta una acumulación de azúcares reductores o fructosa y glucosa. El perfil de las siguientes horas es similar, se detecta la presencia de azúcares reductores, sacarosa, FOS y levanas.

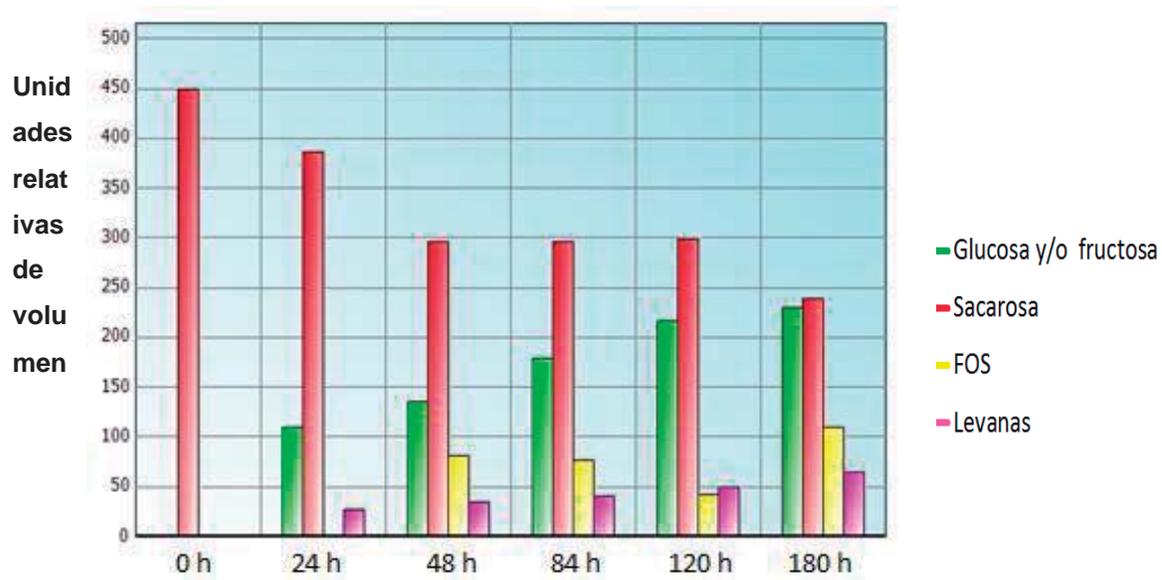


Fig. 27.- Grafico de barras del análisis de las manchas de la Fig. 26c

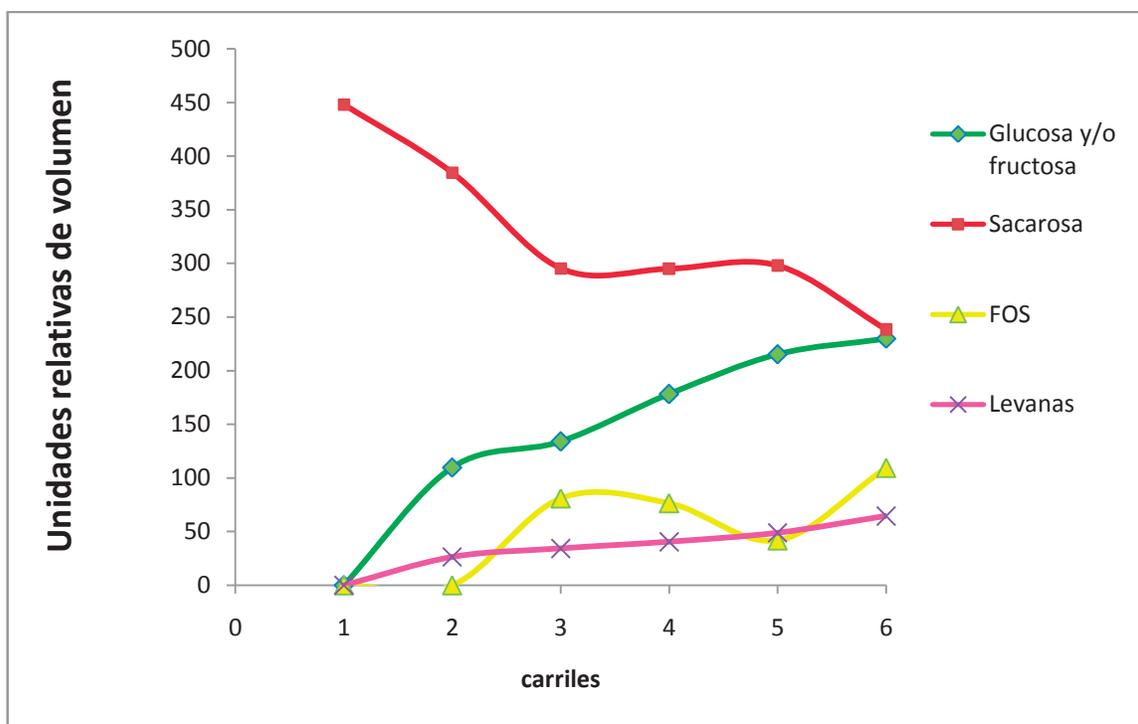


Fig. 28.- Líneas de tendencia de carbohidratos involucrados en fermentación de *G. diazotrophicus* con sacarosa

En la Fig.29 se muestran 3 placas de TLC, las placas miden 20 cm y se dejó 1 cm de separación en el extremo, quedando una distancia recorrida por la fase móvil.

Se aprecia una mancha por muestra. En la placa b se aplicaron muestra de tres tiempos de fermentación , a 0 horas después de agregársele la sacarosa se observó solo una mancha, la de 72 horas mostró 2 manchas fuertes y una mancha tenue que recorrió 2.7 cm. La muestra de 180 horas también mostró 3 manchas al igual que la anterior.

En la placa c se aplicó inulina (I), en el según carril una mezcla equitativa de sacarosa, y nuevamente la muestra de 180 horas de fermentación, después de agregada la sacarosa.

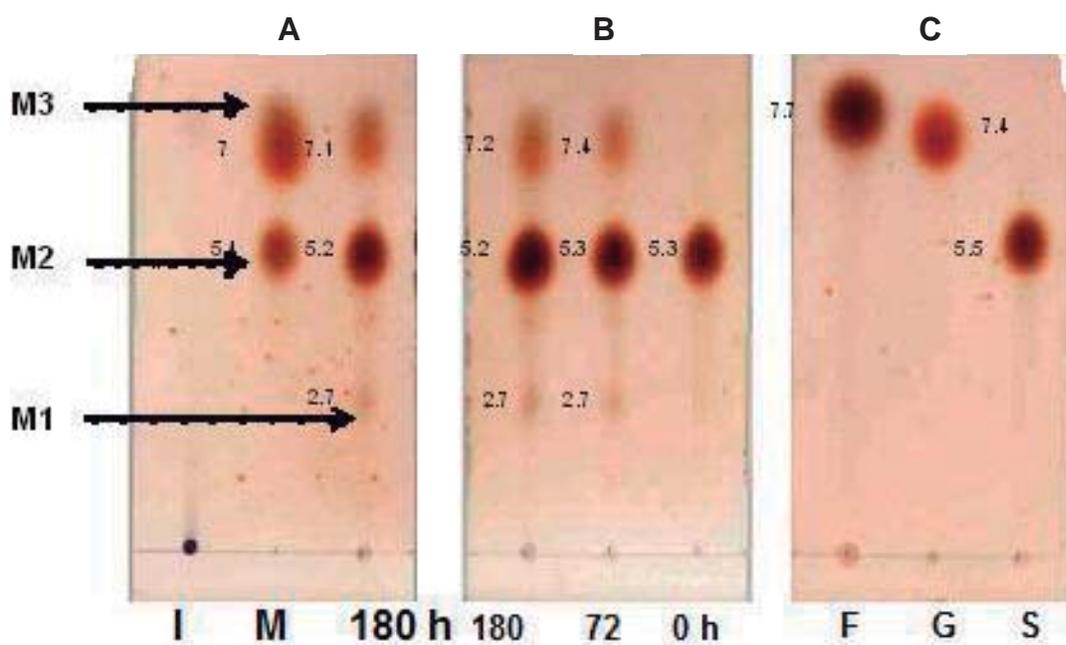


Fig. 29.- Placa de cromatografía de capa fina de 18 cm. La placa C, es una curva patrón que muestra la migración de fructosa (F), glucosa (G) y sacarosa (S), todos los carriles se cargaron con 1µL de muestra, la placa B son tres muestras de fermentación a diferentes tiempos, la placa A se refiere a I=inulina, M=mezcla de fructosa, glucosa y sacarosa.

Con los datos anteriores se midieron las distancias recorridas por las muestras (b), para determinar el factor de retención R_f (retentionfactor) con la siguiente ecuación:

$$R_f = \frac{b}{a} \quad \text{Ecuación 28}$$

En tabla 3 se muestran los resultados obtenidos de la determinación del factor de retención de las muestras aplicadas. La letra M se refiere a la mancha, y se numeraron en tres, siendo la M3 la que migro a una mayor distancia del punto de

aplicación. Los espacios en blanco de la tabla significan que para esa placa no hubo definición de la mancha.

La cantidad de muestra que fue aplicada en estas placas fue de 1 μ L.

				R _f		
	M1 cm	M2 cm	M3 cm	M1 cm	M2 cm	M3 cm
placa a						
S		5.50			0.31	
G			7.40			0.41
F			7.70			0.43
placa b						
0 h		5.30			0.29	
72 h	2.75	5.30	7.40	0.15	0.29	0.41
180 h	2.70	5.25	7.20	0.15	0.29	0.40
placa c						
180 h	2.70	5.20	7.10	0.15	0.29	0.39
M (FGS)		5.40	7.00	0.00	0.30	0.39
I						

Tabla 3.- Factor de retención R_f

Se tomaron como controles la inulina y la muestra de sacarosa, fructosa y glucosa, para el análisis con el programa "Just TLC", se analizaron tres tiempos de fermentación (180, 72 y 0 h), la cuantificación del volumen de la mancha nos permitió determinar relativamente cómo se comportan los carbohidratos en la fermentación, en la Fig. 30 los carriles del 3 al 5 se refieren a los tiempos de fermentación antes mencionados, en el carril 5, la hora 0, como era de esperarse solo aparece una mancha bien definida de sacarosa, mientras que en las 72 y 180 h ya encontramos acumulación de FOS y levanas, en la Fig. 31 se aprecia en base al tamaño de la mancha que hay mayor acumulación a las 180 h.

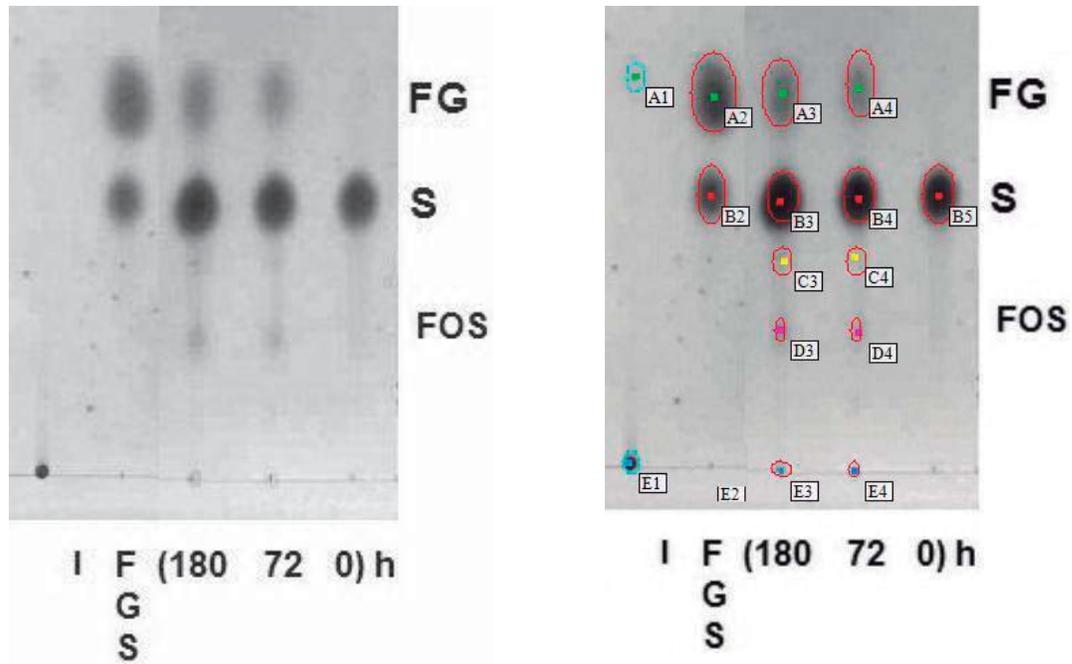


Fig. 30.-Placa de cromatografía de capa fina con controles y tres muestras a diversos tiempos de fermentación

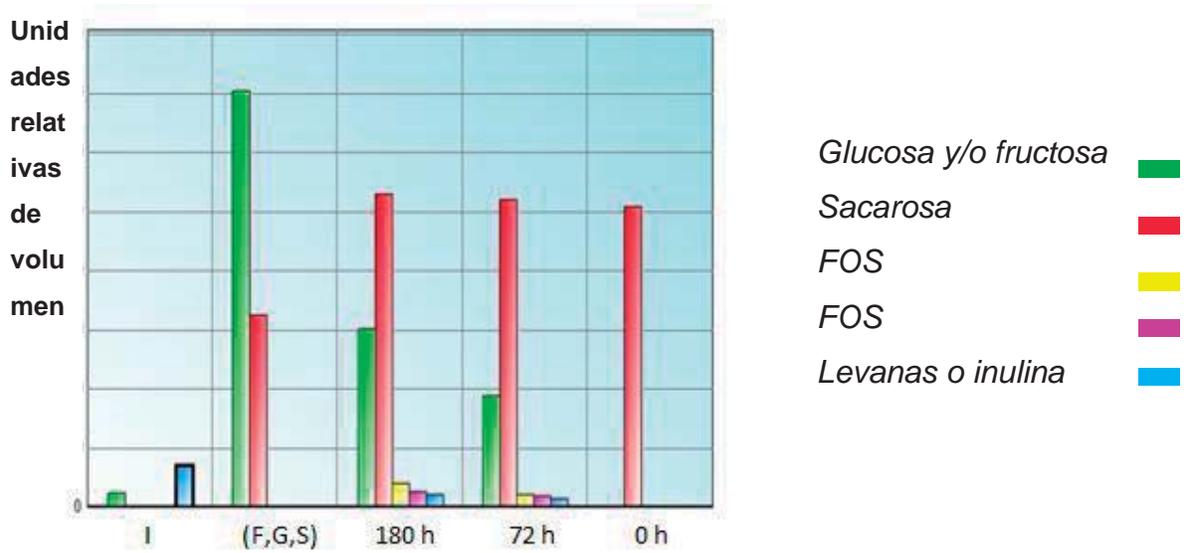


Fig. 31.- Grafica de barras del análisis cromatográfico de la placa mostrada en la Fig. 28 (I= inulina, F,G,S= fructosa, glucosa, sacarosa)

VII.12.- Determinación de concentración de proteína

Las etapas de proceso en las cuales se determinó la concentración de proteínas se encuentra detallada en la tabla 4. Cabe mencionar que el concentrado 1 se refiere a una reducción de 2 L de filtrado a través de la membrana de 0.2 μm a 1 L, es decir una concentración al 50% del volumen total, el concentrado 2 se refiere a un volumen total de 20 mL, es decir que de 2L de filtrado a través de la membrana de 0.2 μm se obtuvieron 20 mL que equivale al 1% del volumen total. El dializado fue utilizado para la inmovilización enzimática partiendo de 0.2429 mg/mL de proteína total en medio. Según Hernández *et al.* (1995), la levansacarasa de *G. diazotrophicus* representa el 70% de la proteína total o 0.17 mg/mL de levansacarasa haciendo los cálculos correspondientes.

En la tabla 4 podemos ver como era de esperarse que a medida que aumentó el tiempo de fermentación aumentó la cantidad de proteína presente en el medio. En el primer filtrado aumentó la cantidad de proteína total, mientras que en el primer concentrado ésta disminuyó, y como se observa hay proteína en el filtrado de 10 KDa, esto quiere decir que las proteínas de pesos moleculares mayores a 10 KDa permanece en el concentrado, ya que en el concentrado 2 aumentó la concentración de proteína.

	Proteína total (mg/mL)	LsdA(mg/mL)
Inóculo	0.0562	0.0393
Fermentación a 0 h	0.1362	0.0954
Fermentación a 72 h	0.2874	0.2012
Fermentación a 192 h	0.3452	0.2416
Sedimento	0.4341	0.3039
Sobrenadante	0.1051	0.0736
Filtrado .2 μm	0.1095	0.0767
Concentrado 1	0.0651	0.0456
Concentrado 2	0.4296	0.3008

Filtrado 10 KDa	0.1051	0.0736
Concentrado.2 μ m	0.6253	0.4377
Dializado	0.2429	0.17

Tabla 4.- Determinación de proteína
(Proteína total determina con Bradford, LsdA= 70% de la proteína total)

VII.13.- Determinación de glucosa

VII.13.1.-DNS

La determinación de glucosa por medio de DNS se realizó mediante determinación de azúcares reductores, utilizando una curva de calibración de glucosa y otra de fructosa. En la Tabla 5 se muestran los resultados de este análisis.

Muestras	Extracto	Agarosa 1 %	Agar 2%	Agar 3%	Agar 4%
	mg/mL				
C-	0.4621	0.4279	0.4621	0.4910	0.4331
C+	0.8269	0.8790	0.8790	0.8790	0.8790
0 min	0.5316	1.1975	1.1222	0.9021	0.8153
6 min	0.9137	1.7881	2.0255	1.3943	1.1338
12 min	0.9774	1.8923	2.4076	1.8865	1.5507
18 min	1.0469	2.0139	2.7203	1.9676	1.6028
240 min	*nd	4.6543	6.2988	6.7389	4.7528
1440 min	11.5333	12.3555	11.9039	11.3133	10.316

* nd= no determinado

Tabla 5.- Determinación de azúcares reductores de la fermentación con extracto enzimático e inmobilizaciones físicas con diversos soportes

Entre los azúcares reductores el principal esperado es el de glucosa y algún remanente de fructosa derivado de la hidrólisis de sacarosa, por esto se sugiere que

entre mayor producción de azúcares reductores es mayor la actividad de la levansacarasa.

En la Fig. 32 se aprecia que en los primeros 4 tiempos de reacción (0, 6, 12 y 18 min) es más efectiva la inmovilización con agar al 2%, ésta supera la producción de azúcares reductores de todos los inmovilizados incluso que el extracto.

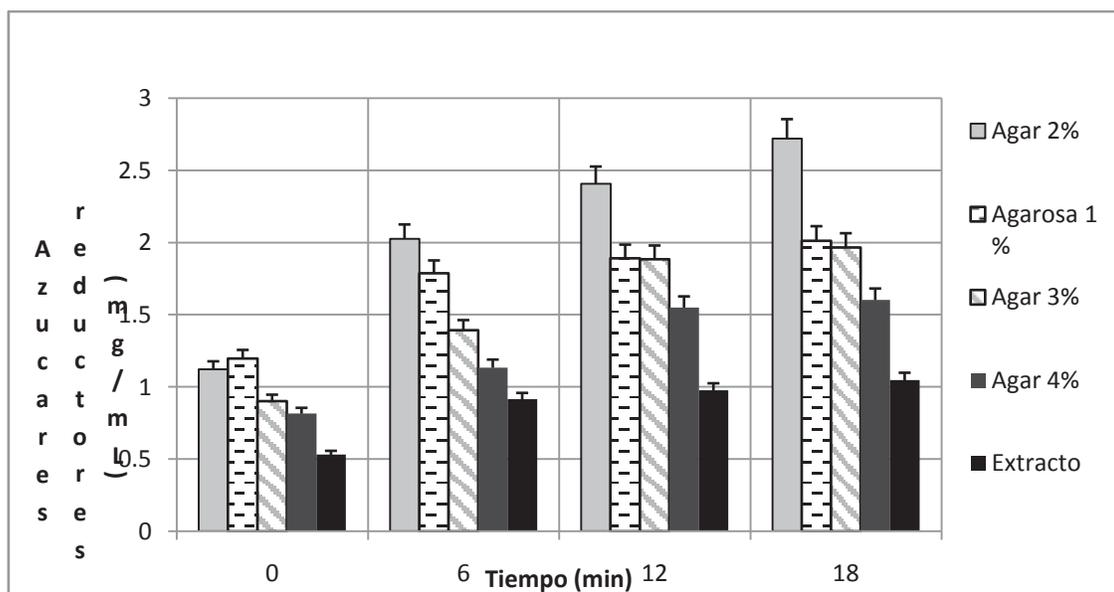


Fig. 32.- Grafico de barras del analisis de azúcares reductores mediante DNS, de 0 a 18 min

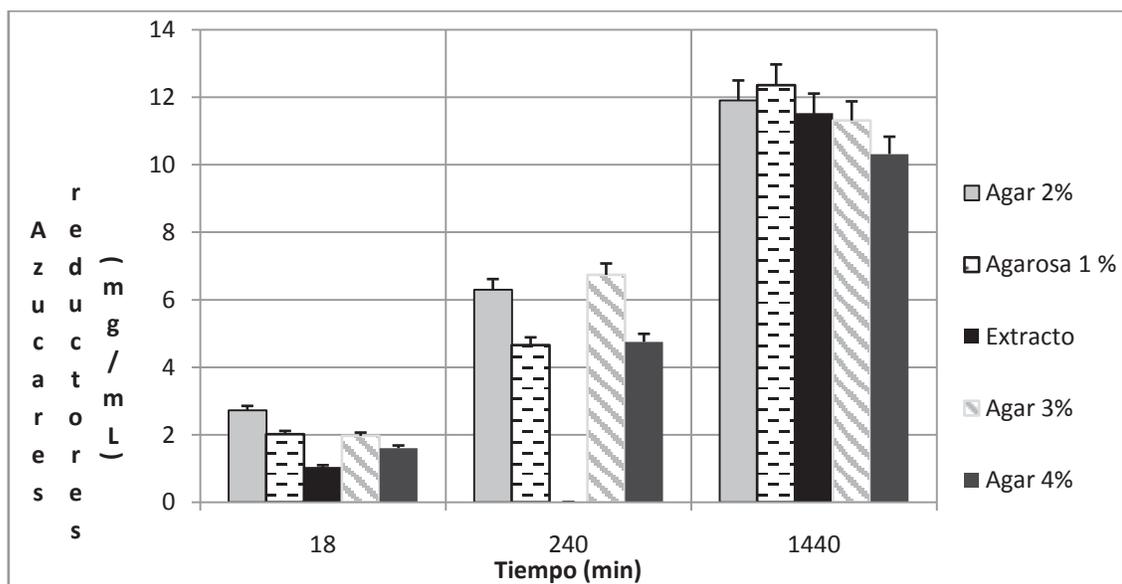


Fig. 33.- Grafico de barras del analisis de azúcares reductores mediante DNS, de 18 min a 1440 min (24 h)

En la Fig. 33 se muestra el análisis de 18 min, 4 h y 24 h, también los inmobilizados con agar 2% y agarosa 1%, son los que mayores azúcares reductores acumularon.

VII.13.2.-HPLC

El análisis de azúcares reductores abrió un panorama en cuanto a los mejores inmobilizados, por lo tanto para el análisis HPLC se tomaron en cuenta el extracto enzimático sin inmobilizar como control de los inmobilizados con agarosa 1% y agar 2%. Los resultados de los tres experimentos se muestran en la Tabla 6.

Tiempo (min)	Extracto	Agarosa 1 %	Agar 2%
	mg /mL		
0	0.4	0	0.03
6	0.41	0.03	0.08
12	0.6	0.15	0.2
18	0.7	0.3	0.4
1440	1.4	0.9	1.3

Tabla 6.- Determinación de glucosa mediante HPLC

En tabla 6 se muestra que había glucosa presente en el medio desde la hora 0, curiosamente en agar al 2% se encontró un pequeño remanente de glucosa en comparación con el extracto, y en el inmobilizado de agarosa al 1% se encontró que no había presencia de glucosa. Esto nos sugiere que el inmobilizado es más eficiente en el inmobilizado con agarosa y que es menos eficiente en agar 2%, aun así en agar 2% aun es eficiente pues la cantidad de glucosa presente en el medio a la hora 0 se redujo después de la inmobilización.

En la Fig.34 se observa en un gráfico de barras el incremento de la glucosa en los ensayos analizados. Se observó un pequeño incremento de glucosa en los primeros 6 minutos en el ensayo del extracto enzimático, sin embargo, fue el que mostró mayor concentración de glucosa final, sin embargo es necesario considerar que se partió de un remanente de glucosa inicial, por lo que el incremento de glucosa fue pequeño en las primeras horas del ensayo de extracto. Comparando con los ensayos de

inmovilización cuyo incremento se observamuchos mayor con respecto al tiempo 0, nuevamente se concluye que la mejor opción de inmovilizado es la de agar 2 %.

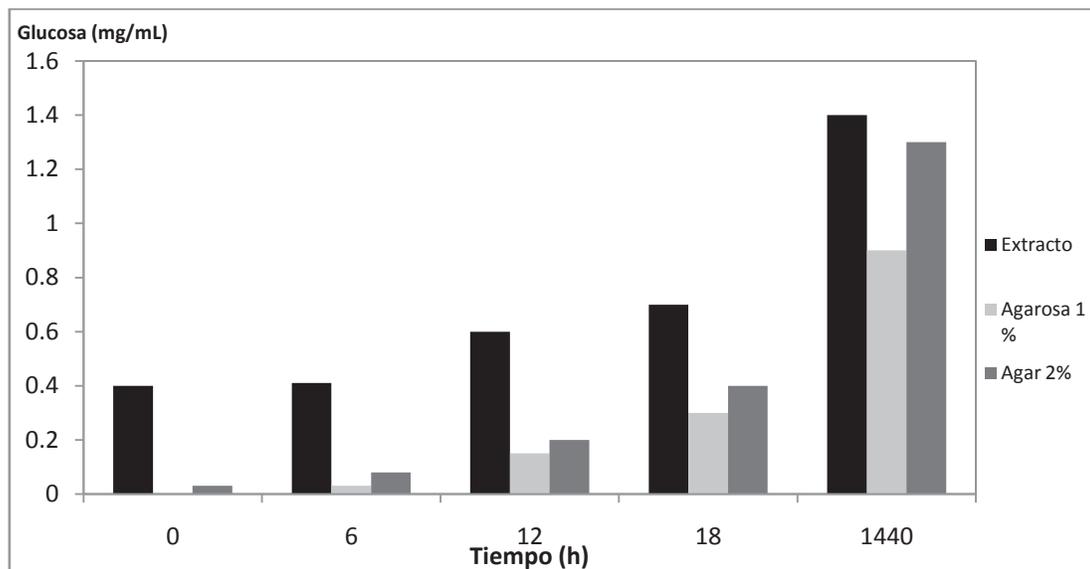


Fig. 34.- Grafico de barras del analisis de la determinación de glucosa por HPLC, de 0 a 1440 min

VII.13.3.- Ensayo enzimático

Los resultados de la determinación de la glucosa liberada mediante la reducción de NAD⁺ se muestran en la Tabla 7, nuevamente se observa que la glucosa contenida en el extracto en el tiempo 0 son mayores que los de los inmovilizados siendo el de agarosa el que inició con menor cantidad de glucosa. Al igual que los resultados de la cuantificación mediante HPLC, la acumulación de glucosa en el ensayo de inmovilización con agar al 2% es más efectiva a las 24 h.

Tiempo (min)	Extracto	Agarosa 1 %	Agar 2%
	mg /mL		
0	0.42427	0.16269	0.26119914
6	0.68585	0.37642	0.60291
12	0.74646	0.62205	0.78155
18	1.03675	0.66352	0.87087
1440	7.1456	4.466	6.1248

Tabla 7.- Determinación de glucosa mediante ensayo enzimático

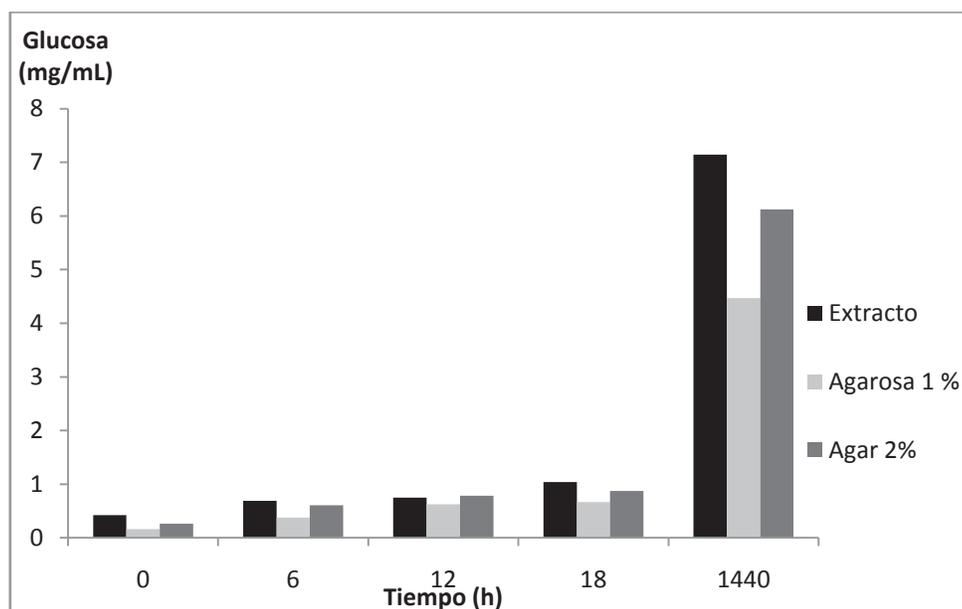


Fig. 35.- Grafico de barras del analisis de la determinación de glucosa por ensayo enzimático, de 0 a 1440 min

En la Fig. 35 se aprecia claramente que la acumulación de glucosa en el ensayo de agar al 2% es mayor al ensayo de inmovilizado con agarosa al 1% en todos intervalos del tiempo.

VII.13.3.- Actividad enzimática

Para la actividad enzimática se siguió el procedimiento ya descrito en materiales y métodos. Cabe mencionar que además de la incubación de los inmovilizados y extracto enzimático con sacarosa, además se incubaron dos controles, el C- que consistía en el inmovilizado o extracto con buffer, y el C+ que consistía en buffer y sacarosa. La actividad enzimática se determinó mediante varios métodos, TLC, DNS, HPLC y mediante un ensayo enzimático.

VII.13.1.-TLC

En la Fig.37, a) se muestra el ensayo realizado al extracto enzimático con sacarosa, del carril 1 al 4 se muestran los tiempos del 0 a 18 min, en el carril 5 se aprecia 24 h de ensayo, los carriles 6 y 7 muestran C- (buffer+extracto) y C+ (buffer+sacarosa) respectivamente y el carril 8 representa el control de azúcares compuesto por inulina,

sacarosa, glucosa y fructosa. Posterior a esto en el b) de la Fig.37 se muestra el análisis de esta placa en el programa “Just TLC”.

En la Fig. 38, se aprecia en base a la intensidad de mancha que de 0 a 24h la mezcla de glucosa y fructosa va en aumento, mientras que la sacarosa va en disminución, esto no se aprecia claramente a simple vista pero si al cuantificar el volumen de la mancha; el control que solo contenía buffer+ extracto enzimático (carril 6), tenía levanas residuales, esto pudo deberse a las levanas de alto peso molecular proveniente de la fermentación para la síntesis de LsdA, el carril 7 es el control que contenía sacarosa y buffer, aquí se determinó una gran cantidad de sacarosa presente y un poco de glucosa y fructosa, estos probablemente sean resultado de una moderada hidrólisis de sacarosa, que pudo causarse en la esterilización de la sacarosa. El carril 8 en la Fig. 38 muestra el control de carbohidratos introducidos en el ensayo, los cuales fueron Inulina, fructosa, glucosa y sacarosa.

La Fig. 36a muestra el ensayo realizado al inmovilizado con agarosa, para los controles, se incubó un cubo de agarosa con buffer para el control negativo de sacarosa (carril 7), y la una mezcla buffer-sacarosa (carril 8). Nuevamente en el carril 9 se muestra el control de carbohidratos involucrado en la fermentación (glucosa, fructosa, sacarosa e inulina como polímero de alto peso molecular). En esta placa se observa que a diferencia de la placa de extracto enzimático, la cantidad de levanas contenidas en ellas fue menor. En la Fig. 36b se muestra el análisis por carriles según la intensidad de la mancha, se observa un incremento más marcado en cuanto a la acumulación de azúcares reductores debido a que los azúcares reductores detectados al tiempo 0 fueron insignificantes, no se pudo detectar una mancha, aunque se detectó una cantidad de levanas muy pequeña, donde se observa una diferencia más marcada es a las 24 h del ensayo. En cuanto a los controles, que se muestran en los carriles del 7 al 9, en la Fig. 37, en el carril 7 que contenía el C- (buffer-perla de inmovilizado) no se observó nada, esto sugiere que existe un inmovilizado bastante eficiente debido a que en el extracto se encuentran levanas residuales así como sacarosa. Los FOS (barras amarillas) solo estuvieron presentes

en los últimos tiempos del ensayo 4 y 24 h (carril 5 y 6). A diferencia del ensayo del extracto.

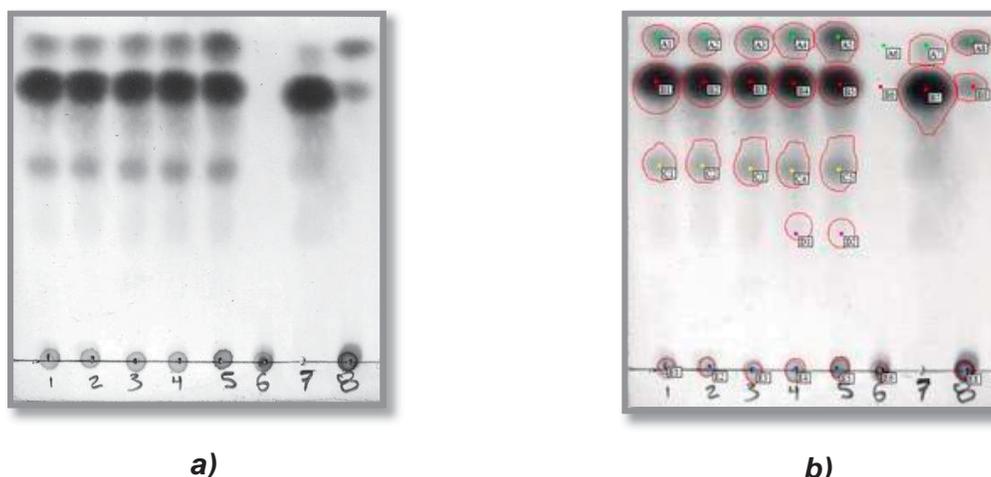


Fig. 36.- a) Placas de cromatografía de capa fina del extracto sin inmovilizar a 0h (1), 6min (2), 12 min (3), 18 min (4), 24 h (5), C- (6), C+(7), Mezcla de glucosa, fructosa, sacarosa e inulina (8); b) Analisis de extracto enzimático por Just TLC

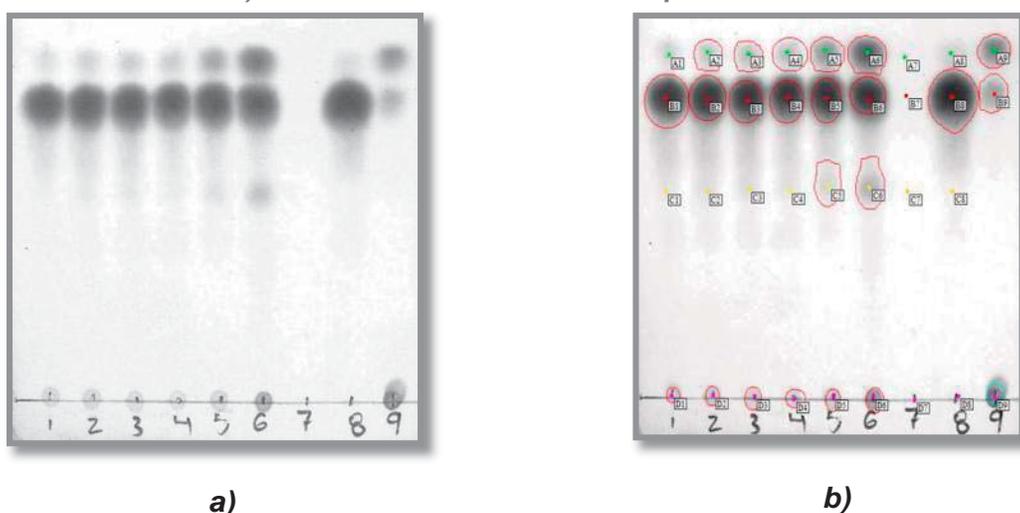


Fig. 37.- Placas de cromatografía de capa fina del inmovilizado con agarosa, 0h (1), 6min (2), 12 min (3), 18 min (4), 4 h (5), 24 h(6), C- (7), C+(8), Mezcla de glucosa, fructosa, sacarosa e inulina (9); b) Analisis de inmovilizado enzimático con agarosa 1% por Just TLC

A continuación se presenta la Fig. 38 donde se muestran todos los ensayos realizados con agar a diferentes concentraciones, el a) es la inmovilización en agar al 2%, el b) el ensayo de la inmovilización al 3% y el c) el ensayo de la inmovilización al 4%, en la parte posterior a estas placas se observa el análisis de manchas realizado por Just TLC.

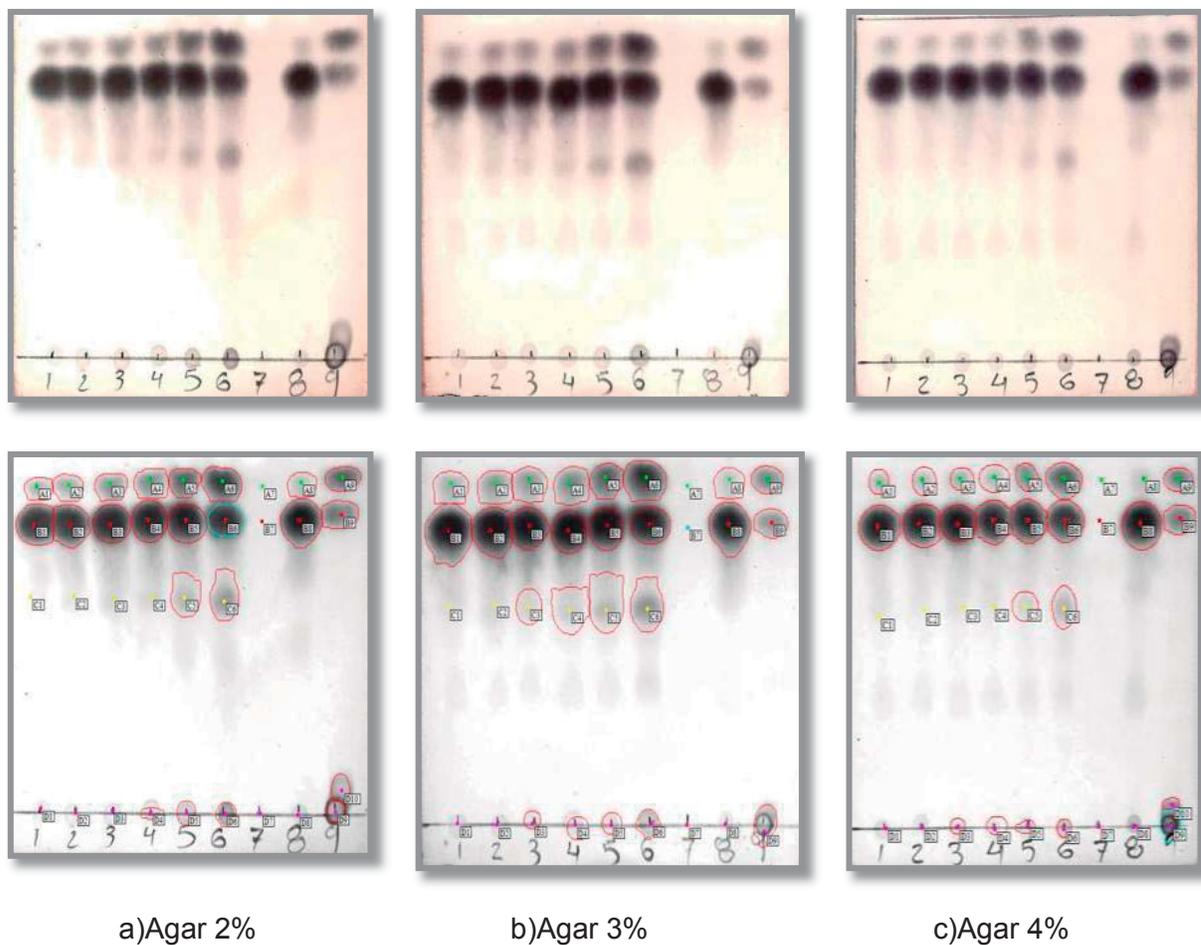


Fig. 38.- Placas de cromatografía en capa fina realizadas a la fermentación con sacarosa de inmovilizado con agar al 2% a), 3% b) y 4% c). 0h (1), 6min (2), 12 min (3), 18 min (4), 4 h (5), 24 h(6), C- (7), C+(8), Mezcla de glucosa, fructosa, sacarosa e inulina (9)

En base al análisis realizado por el programa Just TLC se pudo cuantificar relativamente el tamaño de la mancha expresado en unidades relativas de volumen las cuales se agruparon en la Fig. 39, para comparar el análisis de azúcares reductores en los 5 experimentos realizados, la curva color negra se refiere al extracto enzimático cuyo cambio no es muy marcado, aunque el que menos acumulo azúcares reductores fue el experimento de agar al 4%, agar al 2% y 3% fueron los experimentos que demostraron mayor acumulación de fructosa y glucosa. En los tres ensayos el control negativo (buffer+perla de inmovilizado) no dio ninguna mancha, por lo cual también es importante mencionar que el inmovilizado parece ser muy eficaz, sin embargo, los valores en cuanto a la sacarosa son más marcados en

el inmovilizado de agarosa, aunque la acumulación de azúcares reductores se apreció más claramente en los inmovilizados de agar al 2 y 3%.

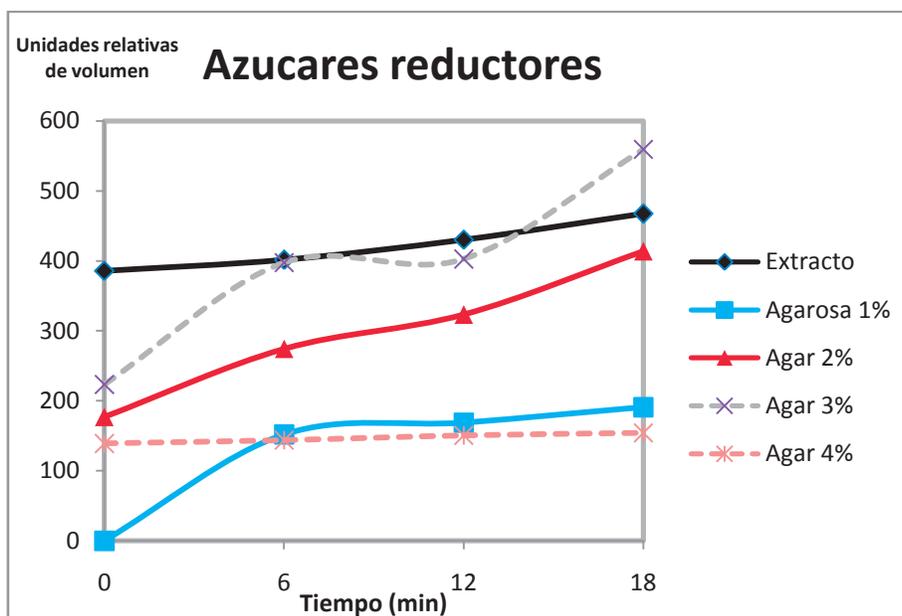


Fig. 39.- Curvas de comportamiento de la determinación de azúcares reductores (fructosa y glucosa) en los 5 experimentos realizados

En la Fig. 40 se observa que el cambio hasta los 18 min es pequeño en el extracto, mientras que en los experimentos se muestra mayor cambio, los resultados de los experimentos de inmovilización son muy parecidos.

En la Fig. 41 se muestra el perfil de formación de levanas, en el extracto no es muy marcada la diferencia, inicia de un valor muy alto de levanas, mientras que los inmovilizados parten de 0 en la formación de levanas, por lo que el cambio de levanas es marcado siendo el mejor perfil el de agarosa 1% y agar 2%.

En la Fig. 42 se muestra el perfil de los FOS sintetizados a las 4 h y 24 h, los que obtuvieron mejores perfiles fueron los ensayos de agar 2% y agar 3%.

El perfil de carbohidratos en los inmovilizados es muy parecido pero cabe mencionar que el ensayo de Agar 4% tuvo menor definición de FOS, Levanas y menor acumulación de azúcares reductores, las mejores opciones para inmovilizar LsdA según los resultados con TLC, son con agarosa 1% y agar 2% para levanas y agar 2% y 3% para FOS.

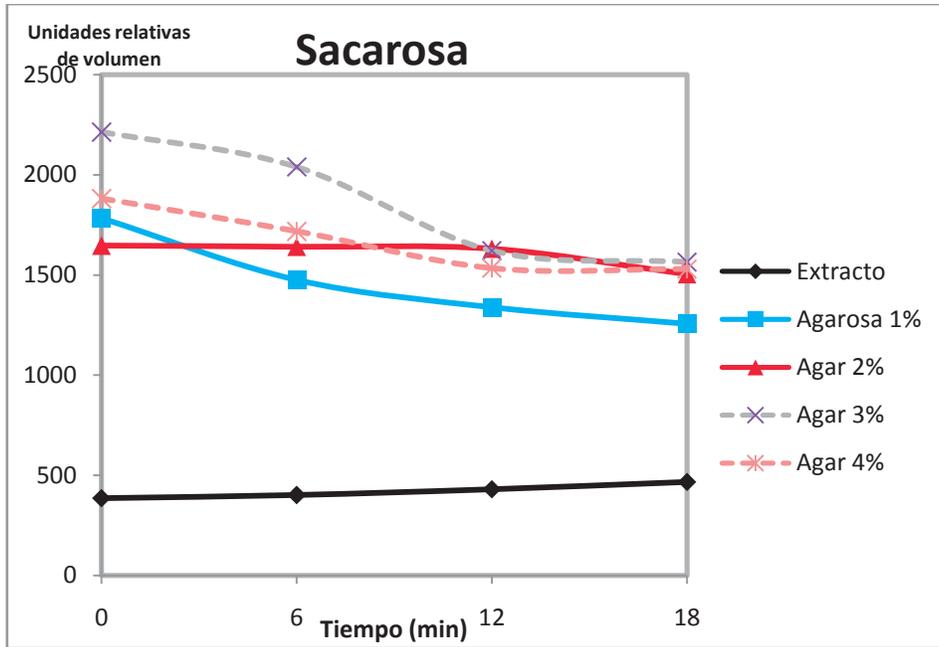


Fig. 40.- Curvas de comportamiento de la determinación de sacarosa en los 5 experimentos realizados

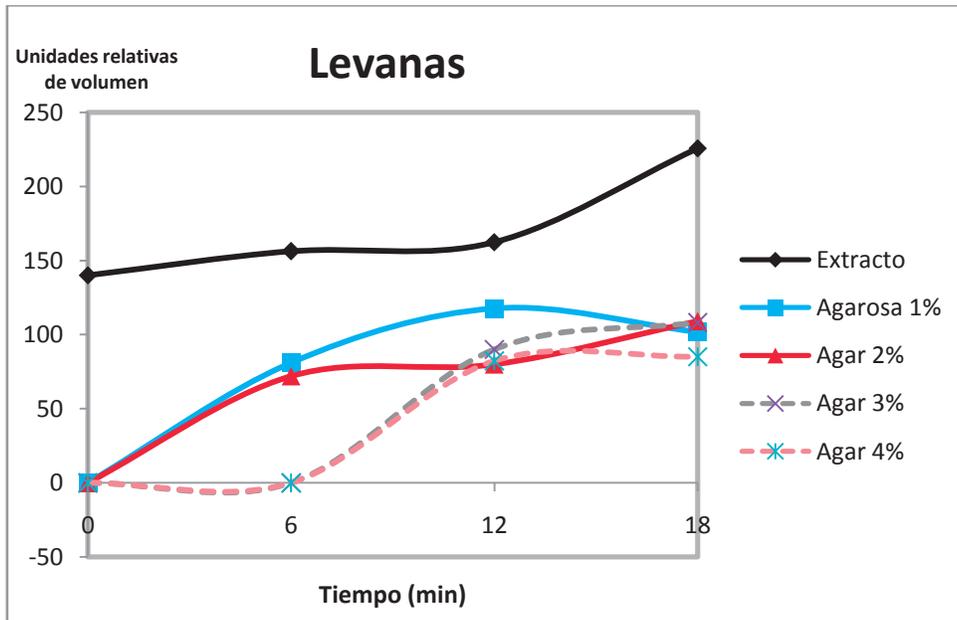


Fig. 41.- Curvas de comportamiento de la determinación de levanas en los 5 experimentos realizados

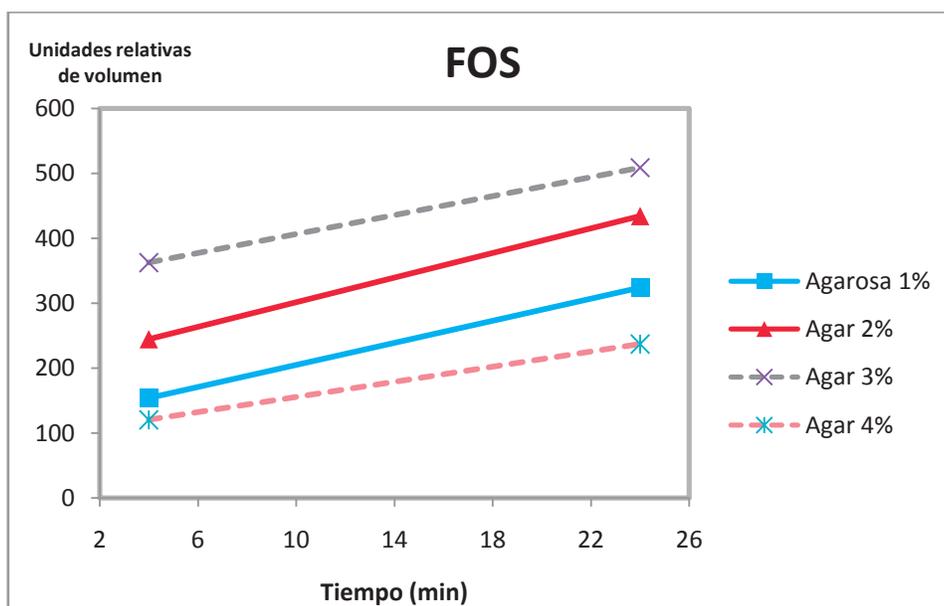


Fig. 42.- Curvas de comportamiento de la determinación de FOS en los experimentos de inmovilización en las ultimas horas del ensayo

VII.13.2.-DNS

Con la cuantificación de glucosa se pudo determinar la actividad específica y total, esta se muestra en la Fig. 43, los tiempos que se muestran son de 0 a los 18 minutos.

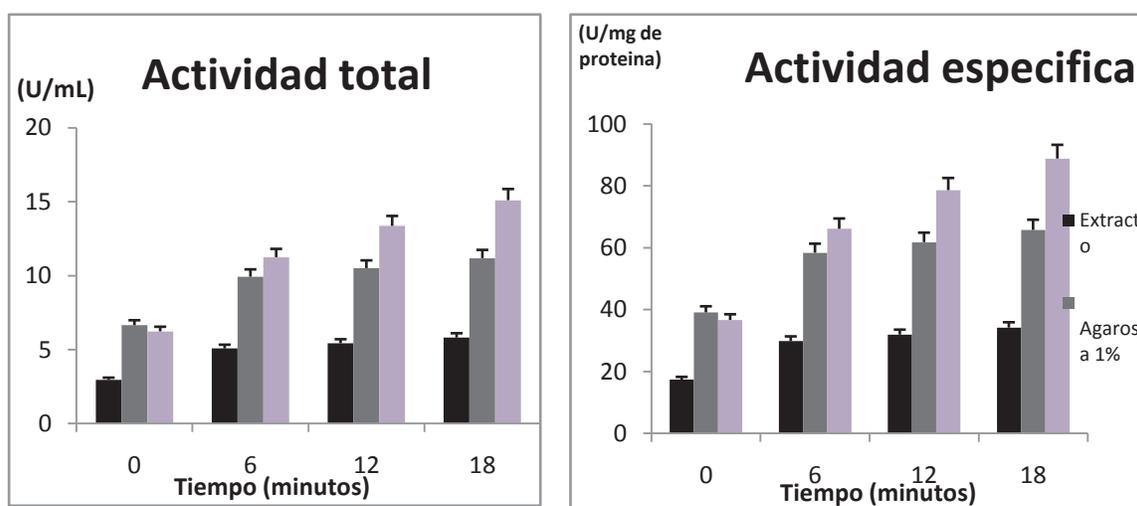


Fig. 43.- Graficos de barras de la determinación de actividad enzimática utilizando DNS, a) Actividad total, b) Actividad específica. *U = Unidades de LsdA

La actividad específica se calculó con la proteína presente en el medio mediante la técnica de Bradford. En la gráfica se muestran 4 tiempos de reacción, los más cercanos, por lo tanto se excluyeron los tiempos de 20 y 24 h. El estudio mediante DNS muestra que hay mayor actividad en el inmovilizado con agarosa 2% incluso en comparación con el extracto.

VII.13.3.-HPLC

A diferencia del DNS en los resultados del HPLC el extracto celular mostró mejor actividad enzimática, esto como ya se comentó y se aprecia en la fig. 44 es debido a que al tiempo 0 la actividad enzimática es alta. Con respecto a los inmovilizados, agar al 2% nuevamente tuvo la mayor actividad, su actividad fue mayor que los inmovilizados con agarosa al 1%.

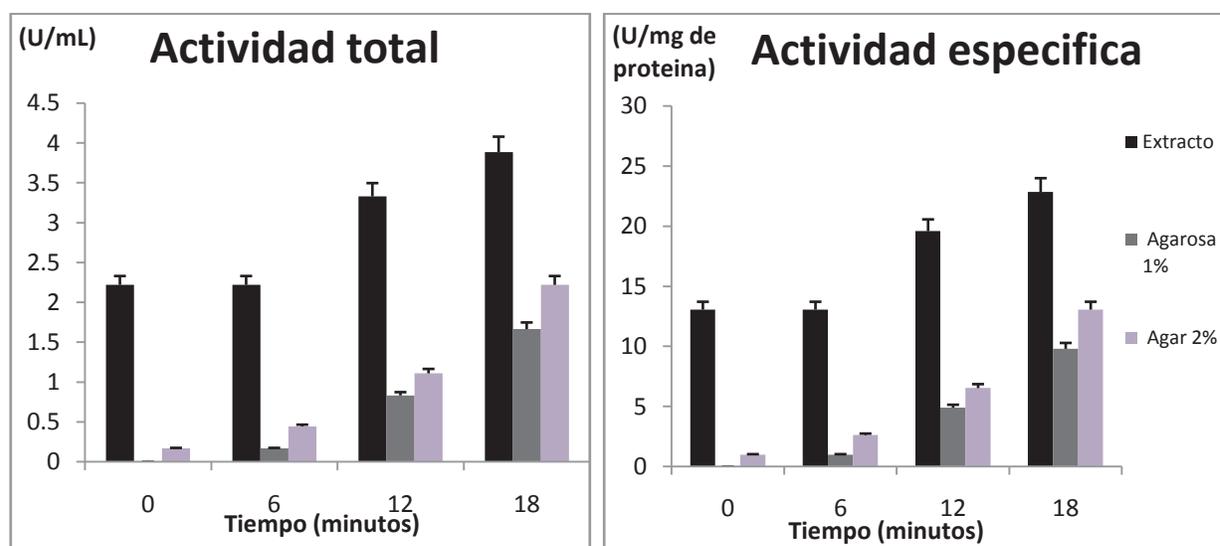


Fig. 44.- Gráficos de barras de la determinación de actividad enzimática utilizando HPLC, a) Actividad total, b) Actividad específica. *U = Unidades de LsdA

VII.13.4.- Ensayo enzimático

Los resultados de actividad obtenidos con ensayo enzimático se encuentran graficados en la Fig. 45. Se observa que la mejor actividad de los inmovilizados fue obtenida con agar al 2%, aunque la agarosa tenga una mejor capacidad de inmovilización, el agar al 2% demostró tener la mejor actividad de los inmovilizados.

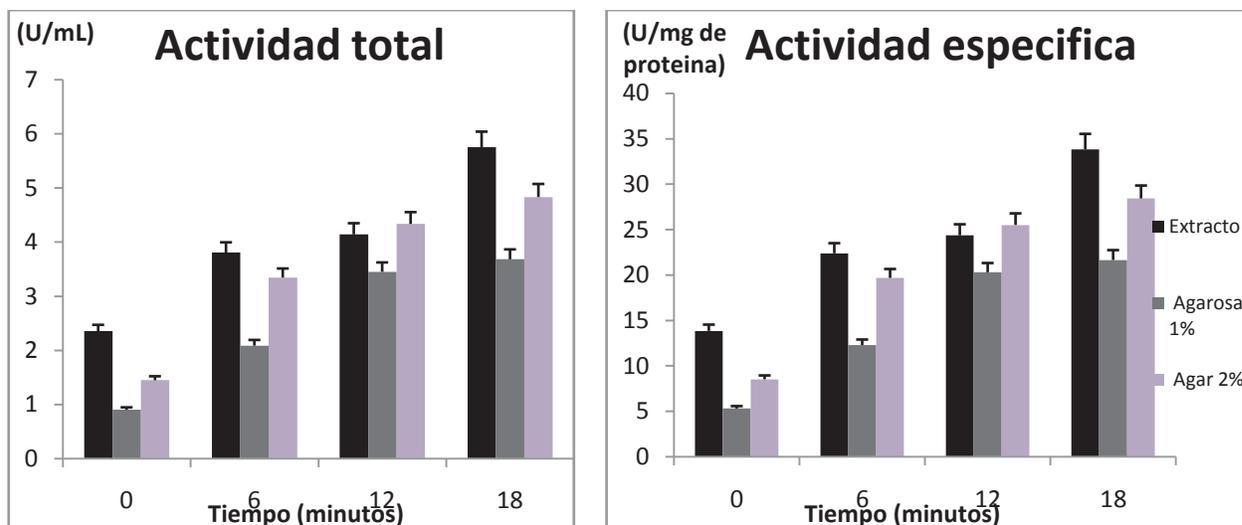


Fig. 45.- Gráficos de barras de la determinación de actividad enzimática utilizando un kit de glucosa. a) Actividad total, b) Actividad específica. *U = Unidades de LsdA

A los 18 min en el ensayo sin inmovilizar se obtuvo una actividad total de 5.75 U/mL, este dato concluyentes mayoral obtenido por Velazquez-Hernandez (2011), quien reportó una actividad total a los 18 minutos de 4.124 U/mL, teniendo por lo tanto un porcentaje de inmovilización de 71.72 %. Los inmovilizados no alcanzaron las actividades del extracto enzimático libre, esto quiere decir que al inmovilizar la proteína se pierde actividad, pero en el caso del agar al 2% la diferencia no es muy grande.

VII.14.- Determinación de FOS y levanas por medio de HPLC

En la tabla 8 se muestran los resultados obtenidos en la síntesis de levanas mediante HPLC, los resultados presentados están en % peso/volumen (w/v), se muestran el extracto y dos experimentos seleccionados por su mejor rendimiento en la síntesis de FOS y Levanas, agarosa 1% y agar 2%. En base a la tabla 8 se realizó la Fig. 46 que muestra el perfil de 4 tiempos distintos de incubación de 0 a 18 min.

Aunque hay mayor cantidad de levanas y FOS iniciales en el extracto, éstos disminuyen en los primeros tiempos y nuevamente se vuelve a acumular. Mientras que los inmovilizados inician con menor cantidad de levanas y el perfil va en constante aumento superando la acumulación de levanas observada en el extracto,

el perfil de agarosa 1% y agar 2% es muy similar, siendo el segundo una opción bastante viable.

Tiempo minutos	FOS y levanas % peso/volumen (w/v)
Extracto	
0	5.7
6	2
12	2.2
18	2.9
1440	1.2
Agarosa 1%	
0	2.5
6	2.5
12	2.7
18	3.2
1440	3.7
Agar 2%	
0	2.5
6	2.6
12	2.8
18	2.9
1440	3.4

Tabla 8.- Determinación de FOS y levanas mediante HPLC

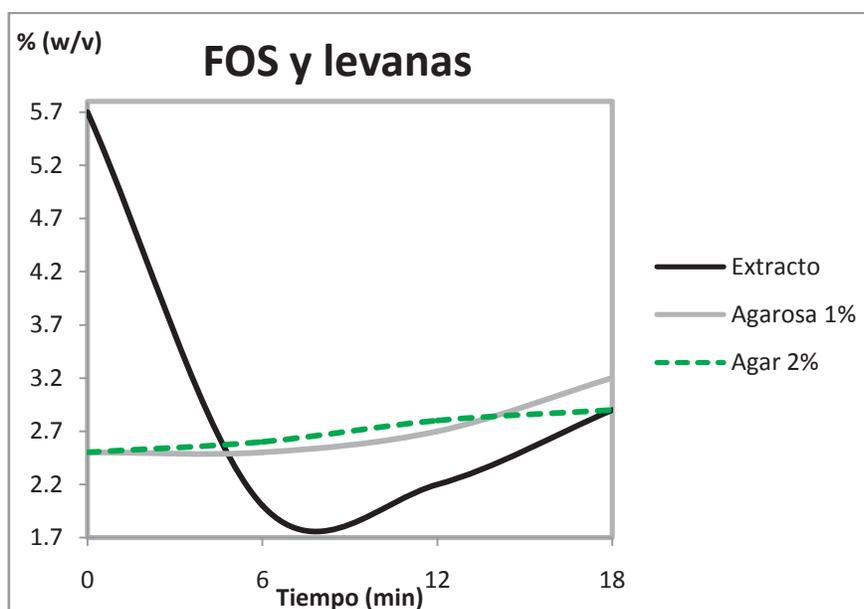


Fig. 46.- Curvas de comportamiento de FOS y levanas en % (peso/volumen) vs tiempo en minutos

VII.15.- Discusión general

En la primera parte de la investigación se determinaron los parámetros cinéticos de *G. diazotrophicus*, los resultados mostrados en la sección VI.1, mostraron que la tasa máxima de crecimiento de *G. diazotrophicus* es muy pequeña a diferencia de otros microorganismos productores de levanas, *Z. mobilis* alcanza valores de hasta 0.15 con sacarosa al 11.3%, y con glucosa al 10% de 0.05 (Favela-Torres y col. 1985), en el estudio de *Z. mobilis* también se demostró que a mayor incremento de sacarosa menor era la tasa máxima de crecimiento disminuyendo hasta en un 60%. La tasa máxima de crecimiento de *G. diazotrophicus* obtenida en este estudio fue de 0.0365 con glicerol al 10% y 0.0125 con sacarosa al 10%. En un estudio realizado por Favela-Torres et al. (1985) se determinó una μ_{\max} de *K. marxianus* de 0.18 utilizando jugo de alcachofa como fuente de alimentación. Comparando estos valores se concluye que la tasa específica de crecimiento es pequeña, siendo esto un obstáculo para aumentar la viabilidad económica de la producción de levanas mediante fermentación con la bacteria, la disminución en la tasa máxima de crecimiento en *G. diazotrophicus* se traduce en un mayor tiempo requerido para llegar a la etapa estacionaria que es donde se producen los FOS y las levanas.

Revisando los rendimientos de sacarosa con respecto a la biomasa cabe mencionar que la etapa más eficiente del consumo de la sacarosa se da en las últimas etapas del experimento esto es después de las 250 h de ensayo o 160 h después de agregarse la sacarosa. En estas últimas horas del experimento se observa que una mayor cantidad de sacarosa es utilizada por menor cantidad de biomasa.

La síntesis de FOS se da en su mayoría en las primeras h del proceso para dar paso a las levanas, cuya formación se favorece en las últimas h del proceso.

En la primer parte de la investigación se abordó el objetivo de caracterizar la cinética de fermentación de *G. diazotrophicus*, para la producción de levanas, cuya caracterización fomento y justifico la segunda parte del proyecto y el objetivo de estandarizar el método de inmovilización de LsdA. Se siguieron varias recomendaciones para inmovilizar el extracto mediante métodos físicos, uno de ellos era mediante alginato de sodio, el cual fue el primer método utilizado (resultados no

mostrados), pero no se obtuvo actividad en el extracto enzimático inmovilizado. Esawy et al. (2008), reportaron que la tasa de inmovilización con el alginato de sodio fue menor al 5%, esta pudo ser la razón por la cual el inmovilizado no muestra actividad, puesto que la cantidad de extracto inmovilizado es muy pequeña. El segundo método de inmovilización enzimática fue utilizando agarosa, que mostró tener los mejores resultados siguiendo la técnica de Esawy et al. (2008). Sin embargo, también se ensayó con diversos porcentajes de agar, siguiendo una técnica alternativa con aceite de girasol estéril. Aunque el porcentaje de inmovilización fue mejor con agarosa, los ensayos de actividad con el inmovilizado con agar al 2%, mostraron mejores resultados. Por lo tanto, esta condición es la que se recomienda para escalar el proceso a nivel industrial. Además de que los mejores resultados de inmovilización se obtuvieron con esta proporción de agar, en estas condiciones se alcanzó un incremento en la actividad del 71.72 % con respecto al extracto celular. Cabe mencionar, que el agar es una alternativa más viable económicamente hablando ya que es menos costoso que la agarosa.

En los estudios con extractos inmovilizados se observó una baja pérdida de actividad, ésta se comportó de manera similar a los estudios utilizando el extracto enzimático puro.

Con los resultados anteriores se valida la hipótesis planteada en este trabajo de investigación: el uso de inmovilización enzimática incrementó el rendimiento en la producción de levaduras de bajo peso molecular, así como de FOS en sistemas de producción continuos.

VIII.-CONCLUSIONES

- Se concluye que el medio LGIE suplementado con glicerol es una buena opción de crecimiento para *G. diazotrophicus*. Aunque el glicerol favorece el crecimiento de *G. diazotrophicus* también favorece la producción de levanas, por lo tanto el glicerol se utilizará tanto para el crecimiento del microorganismo como para la síntesis de levanas con sacarosa.
- El análisis de la cinética de producción de biomasa nos indica que las tasas de crecimiento máximas de *G. diazotrophicus* tanto con glicerol como con sacarosa, son menores que las de otros organismos productores de levanas como *Z. mobilis*, que tiene una tasa máxima de crecimiento de 0.15 h^{-1} , lo cual es una de las desventajas de utilizar *G. diazotrophicus* en procesos de producción de levanas. Sin embargo, se seleccionó esta cepa por las ventajas que ofrece a los procesos de producción; aunque tiene tasas de crecimiento pequeñas, las velocidades de crecimiento se extienden por más tiempo, prolongando su fase de vida y favoreciendo una fermentación continua. Otra característica importante es que se corroboró que *G. diazotrophicus* produce tanto FOS como levanas, simplificando en un mismo proceso la producción de dos prebióticos importantes diferentes.
- En los estudios por TLC y DNS se muestran los resultados de tiempos ensayados, y los ensayos con extracto control e inmovilizados. Se determinó que los mejores protocolos de inmovilización son los realizados con agarosa al 1% y con agar 2%, estos datos correlacionan con los estudios de Esawy et al. (2008), cuyo mejor método de inmovilización mediante atrapamiento físico fueron el de agarosa al 1% y agar al 2%, aunque en ese estudio no se reporta actividad en los protocolos de inmovilización a los tiempos ensayados, podemos concluir que la tasa de inmovilización es mejor en agarosa 1%.
- Aun así todos los estudios realizados en este trabajo de investigación demostraron que la mejor opción para la inmovilización enzimática es con agar al 2%. Aunque el agar tiene una tasa de inmovilización menor a la de la

agarosa, se pierde menos actividad; además, el agar es menos costoso que la agarosa, lo cual la hace más viable para la industria.

- La marcada diferencia en cuanto a la pérdida de actividad puede deberse al método de inmovilización. La agarosa se mezcló con el extracto, se dejó solidificar y se cortó en cubos pequeños, mientras que las inmovilizaciones con agar se realizaron por medio de goteo en aceite. Las esferas resultantes tienen mejor área de contacto, esto pudo ser un factor fundamental en el incremento de la actividad.
- Se superó la síntesis de Levanas y FOS por inmovilización enzimática comparado con el extracto, además de mejorar el rendimiento a tiempos largos.

IX. PERSPECTIVAS

- Determinar la estabilidad de los inmovilizados de extracto de levansacarasa
- Purificar la enzima para incrementar el rendimiento de la actividad en los procesos de inmovilización
- Identificar fracciones proteicas
- Inmovilización celular de *G. diazotrophicus* para incrementar síntesis de levanas
- Buscar métodos alternativos de inmovilización celular de *G. diazotrophicus*, por ejemplo a través de soportes químicos. Recomendamos ensayar con glutaraldehído ya que Esawy et al. (2008) reportan que con glutaraldehído 3% la tasa de inmovilización es mayor al 80%, cantidad superior a la alcanzada al inmovilizar con agarosa.

X. REFERENCIAS Y BIBLIOGRAFÍA

1. Abdel-Fattah, A.F., Mahmoud, D.A., y Esawy, M.A. 2005. Production of levansucrase from *Bacillus subtilis* NRC 33a and enzymic synthesis of levan and Fructo-Oligosaccharides. *Current Microbiology*. **51**: 402-407.
2. Acosta, J.M. 2005. Diccionario de química física. Ed. Díaz de Santos. Barcelona, España pp 622
3. Álvarez, B., & G. Martínez-Drets. 1995. Metabolic characterization of *Acetobacter diazotrophicus*. *Canadian Journal of Microbiology*. **41**:918-924.
4. Arvidson, S.A., Rinehart, B.T., Gadala-Maria, F. 2006. Concentration regimes of solutions of levan polysaccharide from *Bacillus* sp. *Carbohydrate Polymers*. **65** 144–149
5. Baldani, J.I.L., Caruso, V.L.D., Baldani, S.R.G., & Döbereiner, J. 1997. Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biol. Biochem*. **29**:911-922.
6. Barone, J.R., & Medynets, M. 2007. Thermally processed levan polymers. . *Carbohydrate Polymers*. **69**:554-561.
7. Bello, F.D., Walter, J, Hertel, C. and Hammes, W.P. (2001). In vitro study of probiotic properties of levan-type exopolysaccharides from *Lactobacilli* and non-digestible carbohydrates using denaturing gradient gel electrophoresis. *Systematic and Applied Microbiology*. **24**: 232–237.
8. Bergeron, L.J., Morou-Bermudez, E., & Burne, R.A. 2000. Characterization of the fructosyltransferase gene of *Actinomyces naeslundii* WVU45. *Journal of bacteriology*. **182**: 3649-3654.
9. Bezzate, S., Aymerich, S., Chambert, R., Czarnes, S., Berge, O., & Heulin, T. 1994. Disruption of the *Paenibacillus polymyxa* levansucrase gene decreases its ability to aggregate soil in the wheat rhizosphere (Genebank accession No. CAB39327).
10. Bonnett, G.D., Sims, I.M., Simpson, R.J., & Cairns, A.J. 1997. Structural diversity of fructan in relation to the taxonomy of the Poaceae. *New Phytologist* **136**: 11-17.

11. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **72**: 248-254.
12. Bronshteyn, M., & Steinberg, D. 2002. Immobilization of fructosyltransferase from *Streptococcus mutans* on hydroxyapatite surfaces induces the formation of multimeric complexes. *Letters in Applied Microbiology* **34**: 205-209.
13. Calazans, G.M.T., Lopes, C.E., Lima, R.M.O.C. & Franca, F.P. 1997. Antitumor activities of levans produced by *Zymomonas mobilis*. *Biotechnology Letters.* **19**: 19-21.
14. Carpita, N.C., Kanabus, J., & Housley, T.I. 1989. Linkage structure of fructans and fructan oligomers from *Triticum aestivum* and *Festuca arundinacea* leaves. *Journal of Plant Physiology.* **134**: 162-168.
15. Cavalcante, V. & Döbereiner, J. 1988. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant Soil.* **108**: 23-31.
16. Chambert, R., Treboul, G. & Dedonder, R. 1974. Kinetic Studies of Levansucrase of *Bacillus subtilis*. *European Journal of Biochemistry.* **41**: 285-300.
17. Clarke, D.S. 1994. Can Immobilisation be Exploited to Modify Enzyme Activity. *Trend Biotechnology* **12**: 439-443.
18. Combie, J., & Yavorsky, J. 2005. Levan, a renewable raw material for the post-petroleum era. American Chemical Society, Division of Industrial and Engineering Chemistry (229th ACS National Meeting, San Diego, CA).
19. Combie, J., Steel A., & Sweitzer R. 2004. Adhesive designed by nature (and tested at Redstone Arsenal). *CleanTech Environmental. Policy.* **6**: 258-262.
20. Cote, G.L. & Ahlgran, J.A. 1993. Metabolism in Microorganisms Part I. Levan and levansucrase. In *Science and Technology of Fructans.* 141-168. Edited by M. Susuki & N.J. Chatterton. Boca Raton, FL: CRC Press. , pp. 141-168.
21. Cote, G.L. 1988. Production of a constitutive, extracellular levansucrase from *Erwinia herbicola* NRRL B-1678. *Biotechnology Letters.* **10**: 879-882.
22. Dedonder, R. 1966. Levansucrase from *Bacillus subtilis*. *Methods in Enzymology.* **8**: 500-506.

23. Dong, Z., C. D. Zelmer, M. J. Canny, M. E. McCully, B. Luit, B. Pan, R. S. Faustino, G. N. Pierce, and J. K. Vessey. 2002. Evidence for protection of nitrogenase from O₂ by colony structure in the aerobic diazotroph *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Microbiology*. **148**: 2293-2298.
24. Dong, Z., M. J. Canny, M. E. McCully, M. R. Regla-Roboredo, C. Fernandez-Cebadilla, E. Ortega, and R. Rodés. 1994. A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems: A new role for the apoplast. *PlantPhysiol*. **105**: 1139- 1147.
25. Dong, Z., Heydrich, M., Bernard, K. & McCully, M.E. 1995. Further evidence that the N₂-fixing endophytic bacterium from the intercellular spaces of sugarcane stems is *Acetobacter diazotrophicus*. *Appl. Environm. Microbiol*. **61**: 1843-1846.
26. Elisashvili, V.I. 1980. Purification and properties of levansucrase of *Gluconobacter oxydans* L-1. *Biokhimiya*, **45**: 20-27.
27. Esawy, M.A., Mahmoudand, D.A.R & Fattah, A.F.A. 2008. Immobilisation of bacillus subtilis nrc33a levansucrase and some studies on its properties. *BrazilianJournal of ChemicalEngineering*. **25**(02): 237 – 246
28. Favela-Torres, E. & Baratti, J. 1987, The effect of pH, temperature and sucrose concentration on high productivity continuous ethanol fermentation using *Zymomonasmobilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **27**: 121-128
29. Franke, I.H., Fegan M., Hayward C., Leonard G., Stackebrandt E. & Sly L.I. 1999. Description of *Gluconacetobacter sacchari* sp. nov., a new species of acetic acid bacterium isolated from the leaf sheath of sugar cane and from the pink sugarcane mealy bug. *International Journal of SystematicBacteriology*. **49**: 1681-1693.
30. Frey, P.A. & Hegeman, A.D.. 2007. *Enzymatic reactions mechanisms*. Oxford University Press, Oxford NY.
31. Gibson, G.R. & Roberfroid M.B. 1995. Dietary modulation of human colonic microflora: introducing the concept of prebiotic. *Journal of Nutrition*. **125**:1401-141
32. Gillis, M., Kersters, K., Hoste, B., Janssens, D., Kroppenstedt, R.M., Stephan, M.P., Teixeira, K.R.S. & Dobereiner, J. 1989. *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **39**: 361-364.

33. Gross, M., Geier, G., Rudolph, K., & Geider, K. 1992. Levan and levansucrase synthesized by the fireblight pathogen *Erwinia amylovora*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. **40**:371-381.
34. Han, Y. W. and M. A. Watson. 1992. "Production of microbial levan from sucrose, sugarcane juice and beet molasses. *Journal of Industrial Microbiology* **9**: 257-260.
35. Han, Y.W. 1990. Production and Characterization of Microbial Levan. *Advances in applied microbiology*. **35**:171-194.
36. Hendry, G.A.F. 1993. Evolutionary origins and natural functions of fructans – a climatological, biogeographic and mechanistic appraisal. *New Phytologist*. **123**: 3-14.
37. Hernández, L., J. Arrieta, L. Betancourt, V. Falcón, J. Madrazo, A. Coego, and C. Menéndez. 1999. Levansucrase from *Acetobacter diazotrophicus* SRT4 is secreted via periplasm by a signal-peptide-dependent pathway. *Current Microbiology*. **39**:146-152.
38. Hettwer, U., Jaeckel, F.R., Boch, J., Meyer, M., Rudolph, K., & Ullrich, M.S. 1998. Cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of levansucrase genes from the plant pathogens *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* and *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Applied and Environmental Microbiology*. **64**: 3180-3187.
39. Homann A., Biedendieck R., Götze S., Jahn D., y Seibel J. .2007. Insights into polymer versus oligosaccharide synthesis: mutagenesis and mechanistic studies of a novel levansucrase from *Bacillus megaterium*. *Biochem J*. **409**: 189-198.
40. Housley, T.L. & Pollock, C.J. 1993. The Metabolism of Fructans in Higher Plants. In *Science and Technology of Fructans*. 191-223. Edited by M. Susuki & N.J. Chatterton. Boca Raton, FL: CRC Press.
41. Iizuka, M., Yamaguchi, H., Ono, S. & Minamiura, N. 1993. Production and Isolation of Levan by Use of Levansucrase Immobilised on the Ceramic Support SM-10. *Bioscience. Biotechnology and Biochemistry*. **57**: 322-324
42. Jan, K.H., Kang, A.S., Cho, Y., Kim, Y.Y., Lee, Y.J., Hong, K., Jang, E.K., Kim, C.H. & Choue, R. 2002. The effects of levan and inulin on the growth of lactic acid-

producing bacteria and intestinal conditions in rats. *The Korean Nutrition Society*. **35**: 912-918.

43. Jiménez-Salgado, T., Fuentes-Ramírez, L.E., Tapia-Hernández, A., Mascarua-Esparza, M.A., Martínez-Romero, E., & Caballero-Mellado, J. 1997. *Coffea arabica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus*, and isolation of other nitrogen-fixing acetobacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **63**, 3676-3683

44. Kang, S.A., Chun, U.H. & Jang, K.H. 2005. Effect of dietary fructan on cecal enzyme activities in rats. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. **10**: 582–586.

45. Kang, S.A., Hong, K.H., Jang, K.H., Kim, S.H., Lee, K.H., Chang, B.I., Kim, C.H. & Choue, R.W. 2004. Anti-obesity and hypolipidemic effects of dietary levan in high fat diet-induced obese rats. *The Journal of Microbiology and Biotechnology*. **14**: 796–804.

46. Kang, S.A., Jang, K.H., Lee, J.C., Chang, B.I., Lim, Y.A. & Song, B.C. 2003. The effects of fructose polymer levan on the body fat accumulation and serum lipid profiles of Korean women. *Korean Journal of Community Nutrition*. **8**: 986–992.

47. Kang, T.H., Jung, S.J., Kang, S.A., Jang, K.H., Jang, E.K., Kim, S.H., Kim, I.H., Kim, C.H., Rhee, S.K. & Chun, U.H. 2002b. Preparation of levan oligosaccharides by acid hydrolysis and its application in growth of lactic acid-producing bacteria. *Korean Journal of Biotechnology and Bioprocess Engineering* **17**: 137–141.

48. Kang-Soon, A.H., Kyunghye, H., Ki-Hyo, J., Sohye, K., Kyung, H.L., Byung, I. C., Chul-Ho K. & Ryowon, C. 2004. Anti-Obesity and Hypolipidemic effects of dietary levan in high fat diet induced obese rats. *The Journal of Microbiology and Biotechnology*. **14**: 796-804.

49. Kang-Soon, A., Jang, K.H., Seo, J.W., Kim, K.H., Kim, Y.H., Rairakhwada, D., Young, S., Lee, J.O., Ha-Sang, D., Kim, C.H. & Rhee S.K. 2009 *Levan: Applications and Perspectives*. En : *Microbial Production de BIOPOLIMERS and polimers precursors, applications and perspectives* editado por Bernd H.A. Rehm. **6**: 145-161.

50. Kasapis, S., Morris E.R., Grossy, M. & Rodolph K. 1994. Solution properties of levan polysaccharide from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, and its possible primary role as a blocker of recognition during pathogenesis. *Carbohydrate Polymers*. **23**: 55-64.

51. Keith, J., Wiley, B., Ball, D., Arcidiacono, S., Zorfass, D., Mayer, J., & Kaplan D. 1991. Continuous culture system for production of biopolymer levan using *erwiniaherbicola*. *Biotechnology and Bioengineering*. **38**: 557-560.
52. Kim, C.H., Rhee, S.K., Kim, K.H., Kim, K. S., Han, C.S. & Choi, B.R. 2005. Beta-fructosyl-1-ascorbic acid and the preparation method thereof. WO 2005/026183 (Mar. 24, 2005).
53. Kim, Y.Y., Jang, K.H., Kang, S.A., Cho, Y.H., Kim, J.S., Kim, C.H. & Choue R.W. 2004. Effect of type of levan with or without absorption in rats. *The Food Science and Biotechnology* .**13**: 450-454
54. Lammens, W.K.L., Schroeven, R.L., Van Laere ,A., Rabijns, A. & Van den Ende, W. 2009. Structural insights into glycoside hydrolase family 32 and 68 enzymes: functional implications. *The Journal of Experimental Botany*.**3**:727-740.
55. Lee, K.S., Yoo, B.R., Chung, R.H., Kim, M.H., Song, B.J. and Lee, G.J. 2003. The effects of levan diet administration on body composition, blood leptin level and lipids levels in obese women. *Korea Sport Research*. **14**: 549–560.
56. Leibovici, J. y Stark, Y. 1985. Increase in cell permeability to cytotoxic agent by the polysaccharide levan. *Cell and Molecular Biology*. **31**: 337-341.
57. Li, Y., Triccas, J., & Ferenci, T. 1997. A novel levansucrase-levanase gene cluster in *Bacillus stearothermophilus* ATCC12980. *Biochimica et Biophysica Acta*.**1353**: 203-208.
58. Marshall, V.M. and Rawson, H.L. 1999. Effects of exopolysaccharide-producing strains of thermophilic lactic acid bacteria on the texture of stirred yogurt. *International Journal of Food Science & Technology*.**34**: 137–143.
59. Martínez-Fleites, C., Ortíz-Lombardía, M., Pons, T., Tarbouriech, N., Taylor, E.J., Arrieta, J.G., Hernández, L., & Davies, G.J. 2005. Crystal structure of levansucrase from the Gram-negative bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Biochemical Journal*.**390**: 19-27.
60. Marx, S. P., Winkler, S, and Hartmeier, W. 2000. Metabolization of β -(2,6)-linked fructose-oligosaccharides by different bifidobacteria. *FEMS Microbiology Letters*.**182**: 163–169.

61. Marx, S., Koning, S. & Hartmeier, W., 1999. Synthesis of Fructooligosaccharides by Native and Immobilised levansucrase from *Zymomonasmobilis*. Thirteenth Forum for Applied Biotechnology Hept Pand Belgium Proceedings. **64**: 246-251.
62. Menéndez-Rodríguez, C. 2004. Identificación, caracterización molecular y expresión recombinante del gen de la exolevanasa de *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Tesis de Doctorado. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología Departamento de Plantas. Laboratorio de Interacciones Planta-Microorganismos. La Habana, Cuba. 10 pp.
63. Menéndez-Rodríguez, C. 2004. Identificación, caracterización molecular y expresión recombinante del gen de la exolevanasa de *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Tesis de Doctorado. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología Departamento de Plantas. Laboratorio de Interacciones Planta-Microorganismos. La Habana, Cuba. 10 pp.
64. Milward, C.P. & Jacques, N.A. 1990. Secretion of fructosyltransferase by *Streptococcus salivarius* involves the sucrose dependent release of the cell-bound form. *Journal of General Microbiology*. **136**: 165-170.
65. Moffitt, E.A. 1995. Blood substitutes. *Canad. Anaesth. Soc. J.* **22**: 12-19.
66. No, J.R., Park S.Y., Kim M.K., Jo H.Y., Lee I.Y. & Ly S.Y. 2007. The effect of levan on blood lipids and the absorption of calcium in rats fed a low calcium diet. *J. Korean Soc. Food. Sci. Nutr.* **36**: 51-57.
67. Olvera, C. Castillo, E., López-Munguía, A. 2008. Fructosiltransferasas, fructanas y fructosa en: Una ventana al quehacer científico. Instituto de Biotecnología de la UNAM 25 aniversario, cap 29. Mexico, D.F.. UNAM. pp. 327-345
68. Pabst, M.J. 1977. Levan and levansucrase of *Actinomyces viscosus*. *Infect. Immun.* **15**: 518-522.
69. Pérez-Oseguera, M.A., Guereca, A. & López-Munguía, A. 1996. Properties of levansucrase from *Bacillus circulans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45**: 465-471.
70. Sato, S., Koga, T. & Inoue, M. 1984. Isolation and some properties of extracellular Dglucosyltransferases and D-fructosyltransferases from *Streptococcus mutans* serotypes c,e, and f. *Carbohydr. Res.* **134**: 293-304.

71. Song, K.B., Belghith, H., y Rhee, S.K. 1996. Production of levan, a fructose polymer, using an overexpressed recombinant levansucrase. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **799**: 601-607.
72. Song, K.B., Joo, H.K., & Rhee, S.K. 1993. Nucleotide sequence of levansucrase gene (levU) of *Zymomonasmobilis* ZM1 (ATCC10988). *Biochim. Biophys. Acta*. **1173**: 320-324.
73. Song, K.B., Rhee, S.K. 1994. Enzymatic synthesis of levan by *Zymomonasmobilis* levansucrase overexpressed in *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters*. **16**(12): 1305-1310
74. Song, K.B., Seo, J.W., Kim, M.G., & Rhee, S.K. 1998. Levansucrase of *Rahnellaaquatilis* ATCC33071. Gene cloning, expression, and levan formation. *Ann N Y Acad Sci*. **864**: 506- 511.
75. Stephan, M.P.M., Oliveira, K.R.S., Teixeira, G., Martinez-Drets, & Döbereiner, J. 1991. Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **77**:67-72.
76. Tajima, K., Tanio, T., Kobayashi, Y., Kohno, H., Fujiwara, M., Shiba, T., Erata, T., Munekata, M. *et al.* 2000. Cloning and sequencing of the levansucrase gene from *Acetobacterxylinum* NCI 1005. *DNA Res.* **7**: 237-242.
77. Takahama, A., Kuze, J., Okano, S., Akiyama, K., Nakane, T. & Takahashi, H. 1991. Production of lactosucrose by *Bacillus natto* levansucrase and some properties of the enzyme. *J. Jpn. Soc. FoodSci. Technol.* **38**: 789-796.
78. Támbara, Y., Hormaza, J.V., Pérez, C., León, A., Arrieta, J. & Hernández L. 1999. Structural analysis and optimised production of fructo-oligosaccharides by levansucrase from *Acetobacter diazotrophicus* SRT4. *Biotechnology Letters* **21**: 117–121.
79. Tang, L.B., Lenstra, R., Borchert, T.V. & Nagarajan, V. 1990. Isolation and characterization of levansucrase-encoding gene from *Bacillus amyloliquefaciens*. *Gene*. **96**: 89-93.
80. Tejera, N.A., Ortega, E., Rodés, R. & Lluch, C. 2004. Influence of carbon and nitrogen sources on growth, nitrogenase activity, and carbon metabolism of

Gluconacetobacter diazotrophicus. Canadian Journal of Microbiology. **50**, 9. P 745-750

81. Trujillo L. E., J.G. Arrieta, F. Dafhnisa, J. García, J. Valdés, Y. Tambara, M. Pérez, & Hernández, L. 2001. Fructooligosaccharides production by the *Gluconacetobacter diazotrophicus* levansucrase expressed in the methylotrophic yeast *Pichiapastoris*. *EnzymeMicrobialTechnol.* **28**:139-144.

82. Ureta, A. B., Alvarez, A., Ramon, M., Vera, A. & Martinez-Drets, G. 1995. Identification of *Acetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillumseropedicae* and *Herbaspirillumrubrisubalbicans* using biochemical and genetic criteria. *PlantSoil.* **172**:271-277.

83. Van, H,ijum., S.A., Bonting, K., Van der, M.M.J., & Dijkhuizen L. 2001. Purification of a novel fructosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* strain 121 and characterization of the levan produced. *FEMS MicrobiolLett.* **205**: 323-328

84. Van, Hijum., S.A.F.T.,S. Kralj, L.K. Ozimek, L. Dijkhuizen, & G.H. Van Geel-Schutten. 2006. Structurefunction relationships of glucansucrase and fructansucrase enzymes from lactic acid bacteria. *Microbiology and Molecular BiologyReviews.* **70**:157-176.

85. Velázquez- Hernández, M.L. 2011. Efecto de la mutación del gen que codifica para la levansacarasa (*IsdA*) DE *Gluconacetobacter diazotrophicus* sobre la colonización de la caña de azúcar. Tesis de Doctorado. Fac. de veterinaria y zootecnia. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. 54 pp.

86. Velázquez-Hernández, M.L., Baizabal-Aguirre, V.M., Cruz-Vázquez, F., Trejo-Contreras, M., Fuentes-Ramírez, L.E., Bravo-Patiño, A., Cajero-Juárez, M., Chávez-Moctezuma, M.P., Valdez-Alarcón, J.J. 2011. *Gluconacetobacter diazotrophicus* levansucrase is involved in tolerance to NaCl, sucrose and dessication, and in biofilm formation. *Archives of Microbiology.* **193**: 147-149.

87. Vijn, I., & Smeekens, S. 1999. Fructan: More than a reserve carbohydrate? *PlantPhysiology.* **120**:351-359.

88. Xu, Q., Yajima, T., Li, W., Saito, K., Ohshima, Y. &Yoshikai, Y. 2006. Levan (β -2, 6-fructan), a major fraction of fermented soybean mucilage,

displays immunostimulating properties via Toll-like receptor 4 signaling: induction of interleukin-12 production and suppression of T-helper type 2 response and immunoglobulin E production. *Clinical and Experimental Allergy*. **36**: 94–101.

89. Yamada, Y., Hoshino, K.I., & Ishikawa, T. 1998. *Gluconacetobacter* nom. corrig. (*Gluconoacetobacter* [sic]). In Validation of publication of new names and new combinations previously effectively published outside the ILSB, list No. 64. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **48**: 327-328.

90. Yamamoto, Y., Takahashi Y., Kawano, M., Lizuka, M., Matsumoto, T., Saeki, S. y Yamaguchi, H. 1999. In vitro digestibility and fermentability of levan and its hypocholesterolemic effects in rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. **10**:13-18.

91. Yoon, E.J., Yoo, S.H., Cha, J.H. and Lee, H.G. 2004. Effect of levan's branching structure on antitumor activity. *International Journal of Biological Macromolecules*. **34**: 191–194.

XI.- APENDICE A

XI.1.- Curva de calibración peso seco vs densidad óptica

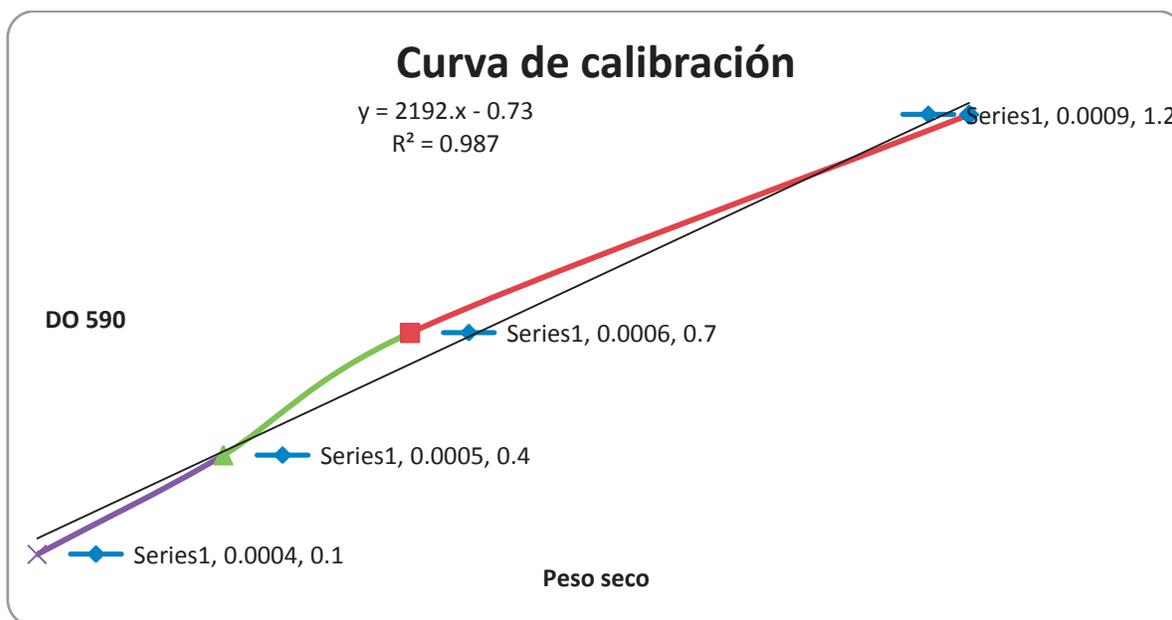


Fig.A1.- Curva de calibración peso seco vs densidad óptica.

$y = 2192.4x - 0.73$ *Ecuación A1*

XI.2.- Curva de calibración para determinación de proteína por el método de Bradford

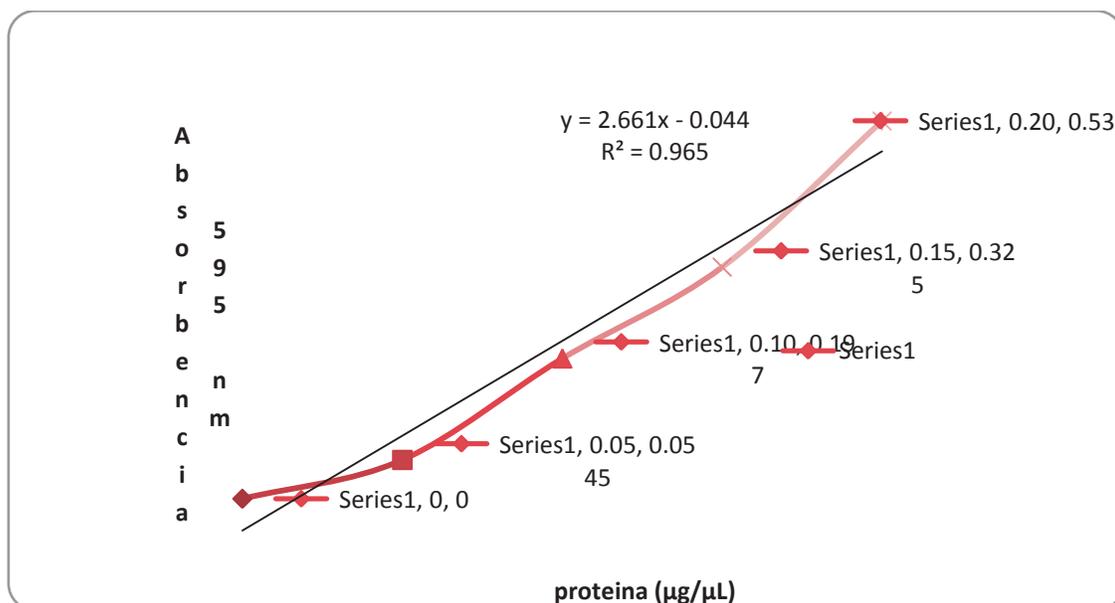
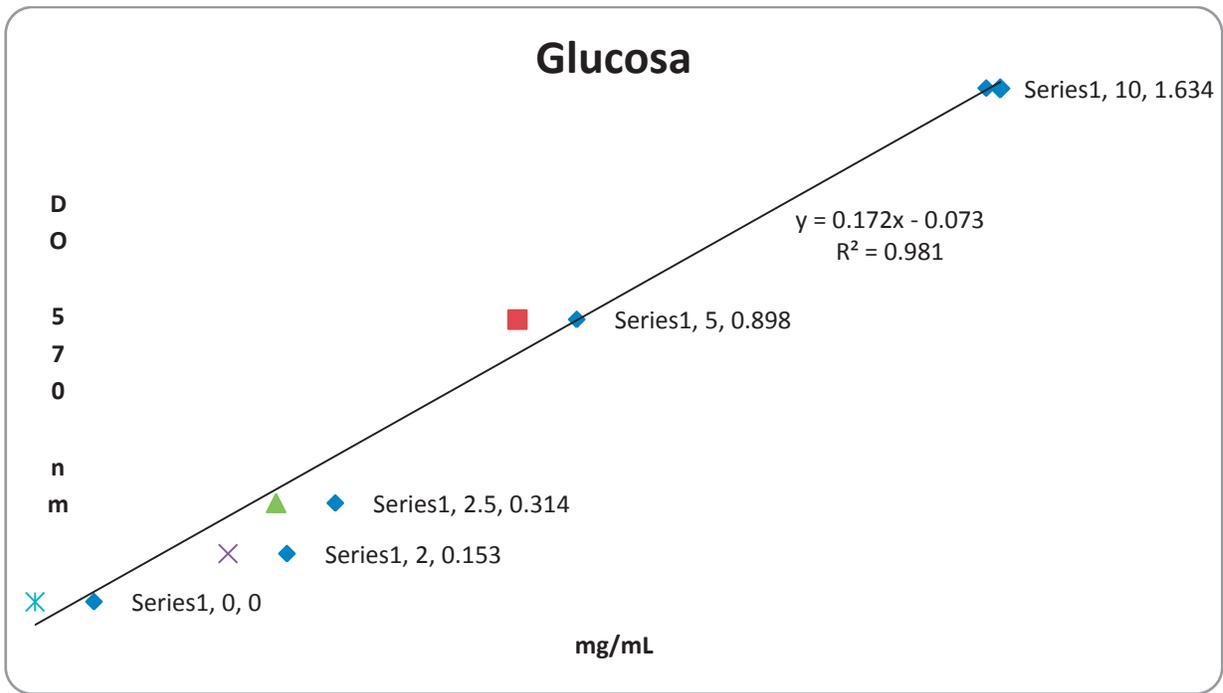


Fig. A3.- Curva de calibración para determinación proteica por el método de Bradford

XI.3.- DNS Curva de calibración de glucosa



XI.4.- DNS Curva de calibración de Fructosa

