UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Producción e inmovilización de la enzima dextransacarasa (DS) producida por *Leuconostoc mesenteroides* para la biosíntesis de dextrano

Nelsi García Salazar

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias

Bogotá, Colombia

2020

Producción e inmovilización de la enzima dextransacarasa (DS) producida por *Leuconostoc mesenteroides* para la biosíntesis de dextrano

Nelsi García Salazar

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Directora:

Ph.D., Biotecnología, Sonia Amparo Ospina

Línea de investigación:

Procesamiento

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias

Bogotá, Colombia

2020

Dedicatoria

A Dios por ser mi guía y darme la fuerza para terminar este plan de vida.

A mi hermana Lucy García Salazar por su apoyo incondicional.

A mi madre Bertha Salazar Cordoba por sus consejos y motivación.

A Luisa Fernanda Rojas García y a Cristian Fernando Rojas García por darme ánimo para seguir adelante y culminar mis metas.

Agradecimientos

Al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional (IBUN), por el apoyo brindado para poder realizar el proyecto.

A mis compañeros Diego Andrés Prada Cardozo, Natalia Comba, Albert Nicolás Niño, Mauricio Bernal por su colaboración y aporte en este proyecto.

A la profesora Sonia Amparo Ospina, por la dirección y colaboración.

A los técnicos, estudiantes y personal administrativo del IBUN por su colaboración.

Resumen

El grupo de Biopolímeros y Biofuncionales del Instituto de Biotecnología ha trabajado en optimizar las condiciones para la producción de la enzima dextransacarasa empleada para la producción del dextrano.

El objetivo de este trabajo consistió en evaluar la producción e inmovilización de la enzima dextransacarasa (DS), producida por una cepa nativa colombiana de *Leuconostoc mesenteroides* IBUN 91.2.98 por fermentación empleando un medio modificado de sacarosa al 6%, con una concentración de fosfatos 0,1 M, pH 7,2 no controlado, temperatura de 30°C, agitación 150 r.p.m y a un tiempo de fermentación de 4 horas. La actividad enzimática se evaluó mediante la determinación de azúcares reductores por el método DNS (ácido 3,5 Dinitrosalicílico) y glucosa por el método de glucosa oxidasa, obteniéndose una actividad hidrolítica de 4,8 a 7,3 U/ml y de transferencia de 4,3 a 7 U/ml. El peso molecular aproximado de la enzima determinada por electroforesis de proteínas (SDS-PAGE) fue aproximadamente de 178 a 180 kDa. La DS se inmovilizó mediante dos métodos: adsorción en Sephadex G-100 y unión covalente a Eupergit CM, obteniendo una actividad hidrolítica baja de 0,051 U/ml para Sephadex G-100 y 0,052 U/ml para el Eupergit CM. La actividad de transferencia no se pudo determinar.

Palabras clave: Dextransacarasa, inmovilización, Dextrano, Eupergit, Sephadex.

Abstract

The Biopolymers and Biofunctionals group of the Biotechnology Institute has worked to optimize the conditions for the production of the enzyme dextransucrase used for the production of dextran. Dextran is a polysaccharide formed by D-glucose molecules, linked primarily by α- (1 → 6) bonds and in the branched chain by α- (1 → 2), α- (1 → 3), α- (1 → 4).

The objective of this work was to evaluate the production and immobilization of the enzyme dextransucrase (DS), produced by a native Colombian strain of Leuconstoc mesenteroides IBUN 91.2.98 by fermentation using a 6% sucrose medium, with a concentration of 0.1 M phosphates, pH 7.2 not controlled, temperature of 30 ° C, stirring 150 r.p.m and a fermentation time of 4 hours. The enzymatic activity was evaluated by determination of reducing sugars by the DNS (3,5 Dinitrosalicylic acid) method and glucose by the glucose oxidase method, obtaining a hydrolytic activity of 4.8 to 7.3 U / ml and the transfer of 4.3 to 7 U / ml. The approximate molecular weight of the enzyme was determined by protein electrophoresis (SDS-PAGE) from 178 to 180 kDa. The DS was immobilized by two methods: adsorption in Sephadex G-100 and covalent binding to Eupergit CM, obtaining a low hydrolytic activity of 0.051 U / ml for Sephadex G-100 and 0.052 U / ml for Eupergit CM. Transfer activity could not be determined.

Keywords: Dextransucrase, immobilization, Dextran, Eupergit, Sephadex.

Contenido

Introducción **1**

Objetivos **4**

Objetivo general 4

Objetivos específicos 4

1. Marco de referencia. **5**

1.1 *Leuconostoc mesenteroides* 5

1.2 Glucosiltransferasas 8

1.2.1 Dextransacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* 10

1.2.2 Producción de dextransacarasa 13

1.3 Purificación de la dextransacarasa 16

1.3.1 Precipitación con polietilenglicol (PEG) 16

1.3.2 Cromatografía 17

1.3.3 Ultrafiltración 19

1.4 Dextrano 20

1.4.1 Biosíntesis de dextrano 23

1.5 Inmovilización y métodos 25

1.5.1 Adsorción 26

1.5.2 Formación de enlaces disulfuro 28

1.5.3 Atrapamiento y entrecruzamiento 28

1.5.4 La unión covalente 30

1.6 Inmovilización de dextransacarasa 32

1.7 Enzimas inmovilizadas empleadas en los alimentos. 36

1.8 Aplicaciones de las enzimas inmovilizadas 37

1.8.1 Hidrolisis enzimática de la lactosa 37

1.8.2 Hidrolisis de proteínas de la leche usando enzimas inmovilizadas. 38

1.8.3 Hidrolizado de proteínas para lactantes. 38

2. Metodología **41**

2.1 Materiales y métodos 41
2.1.1 Identificación del microorganismo nativo 41
2.1.2 Crioconservación 44
2.1.3 Medio de fermentación 44
2.2 Producción de dextransacarasa. 45
2.2.1 Activación de la cepa 45
2.2.2 Fermentación para obtención del extracto 46
2.2.3 Determinación de la actividad enzimática. 46
2.2.4 Cálculos de la actividad enzimática 47
2.3 Determinación de proteínas totales: Método fluorométrico (Qubit). 47
2.4 Purificación parcial y concentración del extracto 48
2.5 Electroforesis SDS-PAGE 49
2.6 Soportes para inmovilizar. 49
2.6.1 Inmovilización de la enzima en Eupergit CM 50
2.6.2 Inmovilización de la enzima en Sephadex G-100 50
2.7 Microscopia electrónica de barrido 51

3. Resultados y discusión 52
3.1 Cepa *Leuconostoc mesenteroides.* 52
3.1.1 Identificación bacteriana por PCR. 53
3.1.2 Secuenciación del producto 54
3.2 Fermentación por lote. 54
3.2.1 Cinética de fermentación de *L. mesenteroides* IBUN 91.2.98 asociada al producto dextrano 54
3.2.2 Purificación y análisis electroforético de la enzima dextransacarasa. 61
3.2.3 Inmovilización de la enzima en Sephadex G-100 66
3.2.4 Inmovilización de la enzima con Eupergit CM 70

4. Conclusiones 73

5. Recomendaciones 75

Anexo A: Determinación de la actividad enzimática de la enzima DS 76

Anexo B: Método de DNS (ácido 3,5 dinitrosalicílico) 84

Anexo C: Método de Glucosa Oxidasa 89

Anexo D: Cuantificación de proteínas empleando el kit de Qubit. 91

Anexo E: Determinación de la actividad del ultrafiltrado 94

Anexo F: Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 96

Anexo G: Inmovilización en Sephadex G-100 y Eupergit CM 102

Anexo H: Secuencia consenso 105

Anexo I: Diámetro de las partículas del Sephadex G-100 106

Bibliografía 108

Lista de figuras

Figura 1- 1: Mecanismo de síntesis de glucansacarasa de las bacterias ácido lácticas ... 7
Figura 1- 2: Cinética de Michaelis Mentel con la cepa IBUN 91.2.98. 12
Figura 1- 3: Producción del dextrano por la enzima dextransacarasa 23
Figura 1- 4: Métodos de inmovilización enzimática 26
Figura 1- 5: Inmovilización de la enzima al Eupergit a través de grupos aminos libres .. 31

Figura 3- 1: Cultivo y observación microscópica de la cepa IBUN 91.2.98..... 52
Figura 3-2: Análisis electroforético de la amplificación del gen 16S RNA r. 53
Figura 3- 3: Comportamiento de la densidad óptica y pH en el crecimiento de *Leuconostoc mesenteroides* cepa IBUN 91.2.98. 55
Figura 3- 4: Actividad de la dextransacarasa a las 4 horas de fermentación. 58
Figura 3-5: Actividad hidrolítica de la dextransacarasa del extracto recién obtenido. 60
Figura 3-6: Actividad transferencia de la dextransacarasa del extracto recién obtenido. 61
Figura 3-7: Análisis de la enzima dextransacarasa mediante electroforesis 63
Figura 3- 8: Electroforesis (SDS-PAGE) de la enzima ultrafiltrada. 65
Figura 3- 9: Perlas en Sephadex G-100 (10X)..... 69
Figura 3-10: Imágenes de microscopia electrónica de barrido (SEM) de las perlas de Sephadex G-100…… 69
Figura 3- 11: Imágenes de microscopia electrónica de barrido del Eupergit CM. 72
Figura D-1: Esquema del ensayo para proteínas usando la metodología de Qubit……..92
Figura I-1: Distribución por tamaño del inmovilizado…… 107

Lista de tablas

Tabla 1- 1: Características de los homopolisacáridos y heteropolisacáridos producidas por las bacterias ácido lácticas. 8
Tabla 1- 2: Dextranos aislados de bacterias ácido lácticas de diferentes alimentos 21
Tabla 1- 3: Análisis nutricional del biopolímero BILAC 22

Tabla 2-1: Medio de cultivo de fermentación..... 45

Tabla 3-1: Purificación de la enzima dextransacarasa. 62
Tabla 3-2: Actividad y rendimiento de la enzima inmovilizada en Sephadex G-100..... 66
Tabla 3-3: Actividad y rendimiento de la enzima inmovilizada en Eupergit CM. 70

Introducción

La demanda de polímeros naturales para ser aplicados en la industria, ha conducido a la exploración de exopolisacáridos microbianos obtenidos con procesos tecnológicos a gran escala, aprovechando los recursos naturales y generando beneficios a la humanidad (Zafar *et al.*, 2018).

El principal microorganismo empleado para la producción de la enzima dextransacarasa a nivel industrial para la obtención del dextrano es *Leuconostoc mesenteroides* B-512 F, una bacteria ácido láctica (BAL) con metabolismo heterofermentativo.

El mercado de las enzimas abarca la industria de los alimentos, bebidas, productos lácteos, panaderías, procesamiento de frutas, verduras, fabricación de cerveza, alimentos para animales y tratamiento para desechos. El comercio global para las enzimas industriales se estimó en el 2015 que fue de 4.500 a 5.000 millones de dólares y gran parte de este comercio fue en el área de los alimentos y bebidas, aumentando el interés en el mejoramiento y optimización en su producción (Guerrand, 2018).

Los bioprocesos catalíticos mediados por enzimas presentan ventajas sobre los métodos convencionales, siendo cada día más importantes en muchas aplicaciones tecnológicas que incluyen protección de medio ambiente, biomedicina, agroquímicos y en la industria de alimentos. Además, los biocatalizadores pueden facilitar los procesos, proteger el medio ambiente, cuando se minimiza el uso de sustancias químicas o se reduce durante la reacción la producción de sustancias tóxicas, obteniendo un producto con mejor rendimiento y calidad (Bilal and Iqbal, 2019).

El grupo de biopolímeros y biofuncionales del Instituto de Biotecnología (IBUN), ha venido trabajando en lograr las condiciones óptimas para la producción de la enzima dextransacarasa para la producción del dextrano, el cual ha sido uno de los primeros

biopolímeros producido a nivel industrial (Groenwall and Ingelman, 1948). Este es un polisacárido complejo formado por muchas moléculas de glucosa, unidas en su principal cadena, en más del 50%, por enlaces glucosídicos α-(1-6). Además, han sido reconocidas sus propiedades biodegradables, biocompatibles y es considerado GRAS (por sus siglas en inglés Generally Recognized as Safe), seguras, por la ausencia de toxicidad al emplear este compuesto aún a altas concentraciones (Aman, Siddiqui and Qader, 2012).

El Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, aisló una cepa a partir de caña de azúcar en el departamento de Boyacá (Colombia) y fue codificada como IBUN 91.2.98. Esta cepa se encuentra crioconservada a -80 ° C en 20% de glicerol y a partir de la cepa original se han realizado subcultivos para su mantenimiento.

La enzima dextransacarasa es producida por fermentación empleando la cepa IBUN 91.2.98 de *Leuconostoc mesenteroides*, no manipulada genéticamente, en un medio de cultivo modificado de sacarosa, obteniéndose un biopolímero con más del 80% de fibra soluble, producto de gran importancia en la producción de alimentos funcionales.

La enzima presenta una actividad de hidrolisis y de transferencia a partir de sacarosa, transfiriendo una molécula de glucosa a la estructura del polímero con liberación de fructosa (Buitrago Hurtado *et al.*, 2013).

El dextrano resultante del proceso de fermentación presenta propiedades físicas y químicas que lo hacen apto para ser empleado en la industria de alimentos y ha sido empleado como fibra soluble, estabilizante, espesante (mermelada y helados) (Naessens *et al.*, 2005), retenedor de humedad, retenedor de aromas, en recubrimiento de frutas, como película comestible en las fresas, arándano, feijoa o prebiótico estimulando el crecimiento de las bifidobacterias (Gómez de Segura *et al.*, 2004; Moncayo, 2013).

Existe un interés creciente en la producción de enzimas inmovilizadas y dentro de estas se encuentra la enzima dextransacarasa usada en la producción del dextrano, que tiene múltiples aplicaciones comerciales. Debido a los inconvenientes como los altos costos de producción teórico (datos del IBUN), aproximadamente 12 dólares /kg (CyberColloids) de producto empleando la enzima libre, baja estabilidad operativa y la falta de reciclabilidad de la enzima y teniendo en cuenta que los gastos de producción de la enzima por kg de producto obtenido, podría reducirse mediante la utilización de un biocatalizador fácilmente

recuperable, se planteó la siguiente pregunta: ¿Es posible la inmovilización de la enzima dextransacarasa de la cepa IBUN 91.2.98 para mejorar la producción de biopolímero dextrano?.

Debido al avance en la biotecnología y el desarrollo de métodos variados de inmovilización, ha surgido en los últimos tiempos el interés en el uso de biocatalizadores en diferentes procesos industriales. En el presente trabajo se empleó dos métodos de inmovilización de la enzima con el fin de obtener un producto dextrano de origen colombiano de menor costo. Los resultados obtenidos aportarán información para entender el comportamiento de la enzima dextransacarasa libre e inmovilizada, proporcionando información en el estudio de la enzima producida por una bacteria nativa acido láctica.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar la producción e inmovilización de la enzima dextransacarasa de una cepa nativa colombiana.

Objetivos específicos

- Desarrollar la cinética de crecimiento de la cepa nativa en un proceso de fermentación para la producción de la enzima.

- Purificar parcialmente la dextransacarasa (DS) para ser utilizada en la inmovilización.

- Estudiar la inmovilización de la enzima dextransacarasa empleando soportes de adsorción y de enlace covalente para la producción del biopolímero dextrano.

1. Marco de referencia.

1.1 *Leuconostoc mesenteroides*

La fermentación ha sido conocida y practicada por la humanidad desde tiempos prehistóricos mucho antes de conocerse los principios científicos, por ejemplo: las producciones de yogur, el queso, eran tecnologías bien establecidas en el antiguo Egipto. Estudios arqueológicos revelaron que el pan y la cerveza fueron importantes en la dieta alimenticia de los egipcios y que ellos tenían conocimiento del proceso de malteado de la cebada, el trigo y de los cultivos iniciadores, que podrían tener bacterias ácido lácticas (BAL). Estos microorganismos se utilizaron para preservar alimentos, debido a la producción principal de ácido láctico durante la fermentación de carbohidratos (EL-Mansi *et al.*, 2012).

En 1861, Louis Pasteur encontró un microorganismo que producía la gelificación del jarabe de caña de azúcar. Luego en 1878, Van Tieghem aisló el microorganismo causante de la gelificación y lo nombró *Leuconostoc mesenteroides.* Posteriormente en 1984, el producto viscoso fue nombrado “dextran”, por su capacidad de rotación óptica positiva (Buchholz and Monsan, 2003).

El género *Leuconostoc spp,* se encuentra en el medio ambiente y ha sido aislado de diferentes lugares como el vegetal, suelos, muestras clínicas, alimentos almacenados en frio, carnes fermentadas, vegetales fermentados (chucrut, kimchi), productos lácteos fermentados (queso, kéfir, yogurt). Este género comprende un grupo de bacterias microaerofílicas, no móviles, cocos pequeños elipsoidales, Gram positivas, catalasa y oxidasa negativas y no forman esporas. Actualmente estas bacterias han sido clasificadas como GRAS (por sus siglas en inglés Generally Recognized as Safe), por ser seguras para el consumo humano (Kongo and Malcata, 2016; Liu-S-Q., 2016).

Las bacterias ácido-lácticas heterofermentativas como *Leuconosctoc*, fermentan azúcares generalmente por la vía fosfocetolasa (PKP) produciendo principalmente ácido láctico, ácido acético, etanol y dióxido de carbono (CO_2) y ocasionalmente ácido fórmico. Crecen a pH cerca a la neutralidad y durante la fermentación el pH baja considerablemente a valores inferiores a 5, por el aumento de la concentración de ácidos orgánicos. Las bacterias ácido lácticas como *Leuconostoc*, sintetizan exopolisacáridos (EPS) que pueden unirse a la superficie de la célula bacteriana formando una especie de cápsula o ser secretados en el medio en donde se encuentran (Holland and Liu, 2011).

Los exopolisacáridos pueden tener diferentes estructuras, tamaños y composición de azúcares y por lo tanto se clasifican en dos grupos: homopolisacáridos (HoPS), consistentes de un tipo de monosacárido (α - D - glucanos, β - D - glucanos, fructanos y otros representados por poligalactano, como la carragenina) y los heteropolisacáridos (HePS) que son moléculas complejas, compuestos por dos o más monosacáridos diferentes (Mayo *et al.*, 2010), (Lynch *et al.*, 2018). En la Tabla 1-1 se describen algunos homopolisacáridos con forma lineal y ramificada y el tipo de enlace.

Tabla 1-1: Homopolisacáridos naturales de cadena líneal y ramificada.

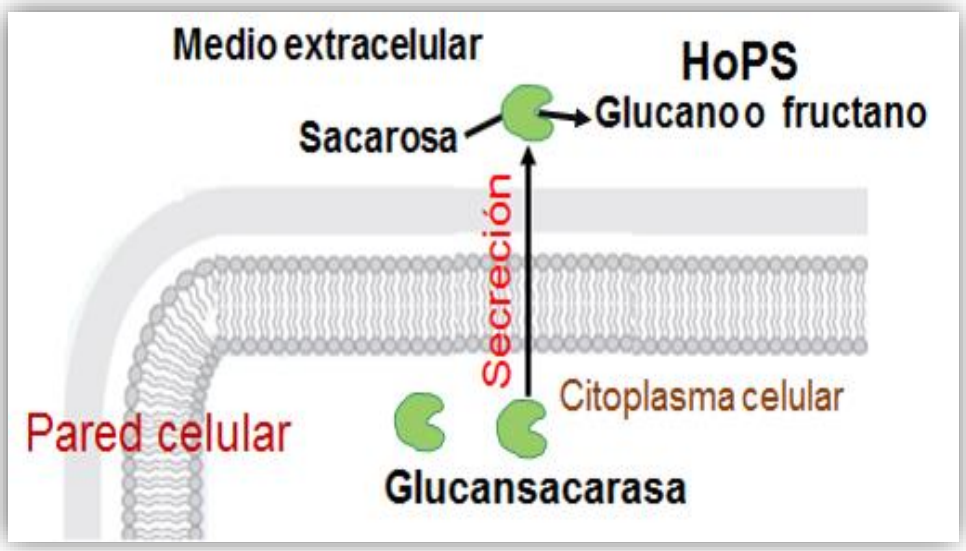
Polisacárido de cadena lineal	Monosacárido/union glucosídica	Polisacárido de cadena ramificada	Monosacárido/union glucosídica
Amilosa	Glucosa α-(1→4)	Amilopectina	Glucosa α-(1→4,1→6)
Celulosa	Glucosa β -(1→4)	Dextrano	Glucosa α-(1→2,1→3, 1→4, 1→6)
Curdlana	Glucosa β -(1→3)	Escleroglucano	Glucosa β -(1→3, 1→6)
Inulina	Fructosa β -(2→1)	Glucógeno	Glucosa α -(1→4,1→6)
Lamarina	Glucosa β -(1→3)	grifolano	Glucosa β -(1→3, 1→6)
Levanas	Fructosa β -(2→6)	lentinano	Glucosa β -(1→3, 1→6)
Quitina	Glucosa-N- Acetilo β -(1→4)	Levano	Frcutosa α -(2→1, 2→6)
Xilano	Xilosa β -(1→4)	pululano	Maltotriosa-α -(1→6)
β -Glucano	Glucosa β -(1→4, 1→3)	Schizophyllano	Glucosa β -(1→3, 1→6)

Las bacterias ácido lácticas como *Streptococcus, Acetobacter o Leuconostoc* crecen en medios que contienen sacarosa y producen una enzima extracelular denominada

dextransacarasa que hidroliza la sacarosa sintetizando un exopolisacáridos derivado de la glucosa (homopolisacáridos), con un alto peso molecular denominado dextrano (Rodriguez and Hanssen, 2007; Mayo *et al.*, 2010).

La HoPS son sintetizados extracelularmente y esta mediada por la acción de la enzima glucansacarasa perteneciente a la clase glucosiltrasferasas (GTFs) (E.C. 2.4.x.y), Figura 1-1. La mayoría de las bacterias acido lácticas productoras de HoPS, secretan una sola enzima glucansacarasa, pero algunas tienen más de un gen glucansacarasa y por lo tanto pueden sintetizar más de un tipo de HoPS, por ejemplo, el prototipo de la bacteria *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F codifica para una glucansacarasa como para una fructansacarasa y se ha demostrado la producción de levano y dextrano. Las GTFs pueden diferenciarse en transglucosidasas (E.C2.4.1.y) y transfructosidasas (E.C2.4.1.y o 2.y) de acuerdo con el producto producido. Dentro de las transglucosidasas se encuentra la dextransacarasa codificada por los genes gft (Lynch *et al.*, 2018).

Figura 1- 1: Mecanismo de síntesis de glucansacarasa de las bacterias ácido lácticas (Lynch *et al.*, 2018).



Los heteropolisacáridos (HePS) microbianos son polímeros complejos compuestos por más de un tipo de monosacáridos los cuales pueden ser ramificados o no ramificados. Los monosacáridos presentes en los HePS son principalmente D - glucosa, D - galactosa, L - ramnosa, y en proporciones diferente. El número de diferentes monosacáridos pueden estar en el rango de 2 a 8. Otros tipos de monosacáridos son la fucosa, manosa, fructosa, monosacáridos N-acetilados (N-acetil glucosamina y N-cetil galactosamina) o monosacáridos sustituidos (glicerol, ácido glucurónico, grupos acetilo y fosfatos). Los HePS de las bacterias acido lácticas formados por *Lactobacillus casei* LC2W en la leche semidescremada están compuestos de glucosa (57,8% mol%), ramnosa (27,7% mol%) y galactosa (14,5% mol%) y los HePS del *Lactobacillus plantarum C88* obtenido del tofu chino está compuesto de glucosa y galactosa (1:2) (Baruah, Das and Goyal, 2016).

Las características de los HoPS y HePS producida por las bacterias ácido lácticas se pueden observar en la Tabla 1-2.

Tabla 1- 1: Características de los homopolisacáridos y heteropolisacáridos producidas por las bacterias ácido lácticas (Lynch *et al.*, 2018).

Homopolisacáridos	Heteropolisácaridos
Contiene un solo tipo de monosacárido.	Contiene más de un tipo de monosacárido.
Mayoría de monosacáridos son: glucosa o fructosa.	Mayoría de monosacáridos son: galactosa y ramnosa.
Generalmente son lineales o ramificados.	Generalmente son ramificados.
Presentan enlaces α **o** β.	Presentan enlaces α **y** β.
Masas moleculares > 10^{6} Da.	Masas moleculares: 10^{4} -10^{6} Da.
Generalmente producido por: *Leuconostoc, Lactobacillus, Oenococcus, Weissella.*	Generalmente producido por: *Lactobacillus, Lactococcus, Bbifidobacterium, Streptococcus*.
Producida extracelularmente de sacarosa, almidón.	Producido a partir de productos intermedios intracelulares.
Producidos relativamente en altas cantidades: gramos /litro.	Producidos relativamente en bajas cantidades: miligramos /litro.
Ausencia de grupos no carbohidratos.	Presencia de grupos no carbohidratos.
Relacionados con capacidad prebiótica.	Relacionados con modulación inmune

1.2 Glucosiltransferasas

De acuerdo con el Comité Internacional de Nomenclatura de Bioquímica y Biología Molecular, las enzimas glucansacarasas (GSs) se clasifican en función de la reacción catalizada y la especificidad del producto. Las Glucansacarasas (GSs) o

Glucosiltrasferasas (GTFs) (E.C. 2.4.x.y) están clasificadas en la familia 70 de las Glucosidohidrolasas (GH70) en el sistema CAZy, una base de datos basada en la secuencia similar de aminoácidos. Las GTFs pueden diferenciarse en transglucosidasas (E.C.2.4.1.y) y transfructosidasas (E.C.2.4.1.y o 2.y) de acuerdo con el producto producido. Las enzimas sintetizadoras de glucano y fructano han sido referidas como Glucansacarasa (glucosiltransferasa) y Fructansacarasa (fructosiltransferasa) respectivamente, (http://www.cazy.org/GlycosylTransferases.html).

Los análisis de metilación del polímero, hidrolisis enzimática, análisis de fragmentos metilados, solubilidad y resonancia magnética nuclear mostraron que existe una variabilidad en la estructura de los glucanos sintetizados (Del moral, 2004). Según la estructura del polímero producido, las GTFs se clasificadas en(Kothari *et al.*, 2015):

a. Dextransacarasas (E.C. 2.4.1.5). El polímero producido se llama dextrano y está constituido por lo menos 50% de enlaces glucosídicos α-(1→6) en la cadena principal y las ramificaciones con enlaces α-(1→2), α-(1→3) o α-(1→4) y varía de acuerdo con el origen de la dextransacarasa. La cepa más ampliamente usada es la *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B- 512F y es la única utilizada industrialmente para la producción del dextrano. El polímero lineal sintetizado contiene un 95% de enlaces α-(1→6) (Rodriguez and Hanssen, 2007).

b. Amilosacarasas (E.C. 2.4.1.4). Cataliza la síntesis de polímeros de amilosa y está compuesto de uniones glucosídicas principalmente α-(1→4). La *Neisseria polysaccharea* produce este tipo de enzima.

c. Alternansacarasas (E.C. 2.4.1.140). Sintetiza el polímero alternana y presenta en su cadena principal en forma alterna enlaces glucosídicos α-(1→6) y α-(1→3). Las cepas productoras de alternansacarasa son *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355, NRRL B-1501 y la cepa NRRL B-1498.

d. Mutansacarasas (E.C. 2.4.1.5). Se diferencia de la dextransacarasa por producir un polímero insoluble en agua, denominado mutana, conteniendo más del 50% de enlace glucosídicos α-(1→3). La enzima es producida por el *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-523, B-1149 y varias cepas de *Streptococcus*.

En condiciones adecuadas, varias especies del género *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* sintetizan dextransacarasa extracelular, siendo la estructura química del dextrano específica a la glucosiltransferasa producida por cada cepa bacteriana (Ahmed and Ahmad, 2017). El tipo y grado de la ramificación del dextrano varía de acuerdo al origen de la dextransacarasa, por ejemplo el *Leuconstoc mesenteroides* cepa NRRL B-742 produce un dextrano con 87% con enlaces α-(1-6), y 13% de α-(1-4) (Buchholz and Monsan, 2003).

1.2.1 Dextransacarasa de *Leuconostoc mesenteroides*

La enzima DS no sólo actúa en la reacción de transferencia de los residuos de la sacarosa para formar el polímero dextrano liberando fructosa, sino en la presencia de aceptores como la glucosa, maltosa e isomaltosa, produciendo oligosacáridos.

La dextransacarasa de *L. mesenteroides* cepa NRRL B-1299 sintetiza cadenas lineales de oligosacáridos con α- (1→2) y oligosacáridos ramificados cuando el aceptor de la reacción es la maltosa. Los dextranos ramificados contienen entre 27-35% de enlaces ramificados α-(1→2) (Dols, Remaud and Monsan, 1997). Los oligosacáridos con este tipo de enlaces exhiben propiedades prebióticas y son comercializados bajo la forma de BioEcolia.
La dextransacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* cepa B-1299 es producida en dos formas: una enzima soluble y una forma insoluble. La forma insoluble corresponde al 60-95% de la actividad total producida y su recuperación está asociada con la capa celular después de la centrifugación (Gómez De Segura *et al.*, 2003).

La dextransacarasa es una interesante enzima debido a su capacidad de sintetizar oligosacáridos que son hidrolizados en el tracto gastrointestinal y promueven el crecimiento selectivo de ciertas bacterias benéficas como *Bifidobacterium* o *Lactobacillus* (Gómez de Segura *et al.*, 2004).

El grado, naturaleza y longitud de la ramificación está relacionada con la cepa bacteriana que produce la enzima y las condiciones en las que se sintetiza el polímero. La enzima dextransacarasa de *Leuconostoc mesenteriodes* cepa NRRL B512 F, produce dextranos con pocas ramificaciones conteniendo el 95% de enlaces α-(1→6) y 5% enlaces α- (1→3). Este polímero es altamente soluble en agua, debido a la orientación de los hidróxidos de las glucosas en los enlaces α- (1→6) en el agua. Esto explica el uso de la enzima en la producción de ciertos tipos de dextrano (Monsan *et al.*, 1987).

El tamaño de la enzima dextransacarasa de *L. mesenteroides* ha sido estudiada, reportándose pesos moleculares de 64 kDa a 185 kDa (Kobayashi and Matsuda, 1980),(Sanchez *et al.*, 1999). El aislamiento del gen que codifica para esta enzima sugirió una proteína con una total de 1527 aminoácidos que corresponde a un peso molecular de 170 kDa. Los valores más bajos del peso molecular sugieren una degradación proteolítica debido a las proteasas presentes en el medio, mientras que los valores más altos se pueden atribuir a la contaminación de la proteína por el dextrano. En los extractos de cultivo obtenidos de las cepas NRRL B-512F y B-512FMC encontraron una proteasa de 30 kDa y su producción y actividad dependió del pH del medio, observándose a pH 7 y a 37° C, hidrolisis de la enzima dextransacarasa de un peso molecular de 173 kDa a varias formas de la enzima con pesos moleculares de 120 kDa, conservando la proteasa el 13 % de su actividad a un pH 5.2 y a 30°C (Sanchez *et al.*, 1999).

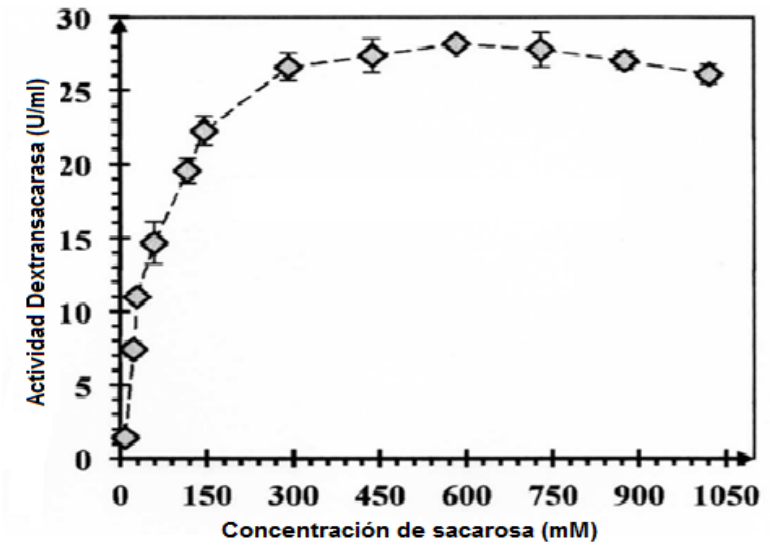
En un estudio controlado de la proteólisis de la dextransacarasa B 512F purificada, encontraron que el proceso proteolítico se aceleraba con la temperatura a pH 8 y mediante ensayos de actividad proteolítica, observaron que los inhibidores de proteasa no detienen el proceso proteolítico. Al realizar una secuencia de aminoácidos de la enzima dextransacarasa buscando el motivo DXG (sitio activo de la TcdB autocatalítica proteasas), encontraron los motivos DTG y DSG. El motivo DTG se encuentra dentro del dominio catalítico de la enzima, sugiriendo que el proceso proteolítico que experimenta la enzima dextransacarasa es de naturaleza autocatalítica (Mellano, 2009).

En el 2017, Miljkovic, M *et al*, aislaron *L. mesenteroides* T3 a partir del agua de los granos kéfir y produjeron la enzima dextransacarasa, realizando la fermentación en el clásico

medio de Tsuchiya en condiciones estáticas a 23 °C, obteniendo una actividad de 3,1 U/ml (Miljkovic *et al.*, 2017).

Florez estudió en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional el efecto de la sacarosa sobre la actividad de la enzima dextransacarasa empleando el microorganismo *Leuconostoc mesenteroides* cepa IBUN 91.2.98, cultivado en diferentes concentraciones de sacarosa como sustrato entre 8,76 mM (3 g/l) y 1022 mM (350g/l), reportando una cinética de Michaelis- Menten observada en la Figura 1-2.

Figura 1- 2: Cinética de Michaelis Mentel con la cepa IBUN 91.2.98 (Flórez, 2014).



En la Figura 1-2, se observa la cinética de la enzima, en donde la velocidad máxima obtenida (Vmax) fue de 27,1 U/ml y una constante de Michaelis (Km) de 4,9 mM. Estos valores fueron calculados el modelo de Hanes- Woolf (Flórez, 2014). La inhibición por sustrato a altas concentraciones de sacarosa puede ser ocasionada por la dificultad del sustrato a acceder al sitio activo por el producto dextrano, observándose una disminución de la actividad enzimática.

La forma activa de la enzima dextransacarasa in situ fue confirmada realizando un zimograma o electroforesis en geles SDS-PAGE en condiciones no desnaturalizantes en presencia de sacarosa 146.1 mM. La confirmación de la formación del polisacárido en los geles de poliacrilamida se realizó mediante el método de PAS (*periodic acid-Schiff*), la

bandas de color rosado oscuro confirmó la presencia de dextrano (Flórez, Buitrago and Ospina, 2018).

1.2.2 Producción de dextransacarasa

La producción de la enzima dextransacarasa empleando *Leuconostoc mesenteroides* en caldo de cultivo con sacarosa y con la producción de dextrano ha sido estudiada en diferentes procesos de producción, continuos y discontinuos (Tsuchiya and Koepsell, 1952; Robyt, Kimble and Walseth, 1974; Robyt and Walseth, 1979; Lopez and Monsan, 1980; Monsan *et al.*, 1987; Preciado, 2003).

La producción de la enzima varía dependiendo de las condiciones de la fermentación como la concentración del extracto de levadura, concentración de sacarosa, pH, temperatura, aireación, y concentración de fosfatos (Lazić *et al.*, 1993; Dols, Remaud and Monsan, 1997; Michelena *et al.*, 2003; Rodrigues, Lona and Franco, 2003).

El microorganismo *L. mesenteroides cepa* NRRL B-512F se cultivó en medio de Tsuchiya *et al*, con concentraciones de sacarosa al 4%, extracto de levadura de 1,5% y de fosfatos de 2,5%, obteniendo una actividad máxima de 6,7 U/ml (Goyal and Katiyar, 1997).

La enzima dextransacarasa *de L. mesenteroides* cepa NRRL-640 fue producida en el medio descrito por Tsuchiya *et al*, empleando concentraciones de extracto de levadura, como fuente de nitrógeno de 1,5% a 4%, obteniendo un incremento en la actividad de la enzima a medida que se aumentaba la concentración del extracto de levadura. La máxima actividad obtenida fue de 5,9 U/ml con una combinación de 4% de extracto de levadura, 7% de sacarosa y 3% de K_2HPO_4. Debido a las características de solubilidad del dextrano producido por esta cepa, no se presenta las dificultades de viscosidad en el medio para la determinación de la actividad enzimática reportada en el cultivo de la cepa *L. mesenteroides* NRRL B-512 (Purama and Goyal, 2007).

Alsop encontró que durante la fermentación la máxima producción de la dextransacarasa ocurría a un pH constante de 6,7 y la temperatura de 30°C favorecía el crecimiento del *Leuconostoc* para la producción del dextrano (Alsop R. M, 1983).

Investigadores informaron que la producción de la enzima fue máxima en el rango de pH de 6 a 7 y la actividad de la enzima decrecía al final de la fermentación en todos los cultivos, debido a las desfavorables condiciones del pH en el caldo (Goyal, Nigam and Katiyar, 1995) .

Tsuchiya *et al*, reportaron que la temperatura óptima para la producción de la enzima de *Leuconosctoc mesenteroides* fue de 25°C en un medio con 2% de sacarosa. Además, el KOH o el NaOH fue requerido para mantener el pH durante la producción de la enzima (Tsuchiya and Koepsell, 1952).

En 1979, Robyt y Walseth observaron que la producción de la enzima de *Leuconostoc mesenteroides* B-512F, se incrementaba dos veces por la adición en el medio de cultivo de 0,005% de cloruro de calcio (Robyt and Walseth, 1979).

En 1992 Veljkovic estudió el efecto de la transferencia de oxígeno haciendo fermentación en lote para la producción extracelular de la enzima dextransacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* sin control del pH, encontrando que el valor óptimo para el crecimiento del microorganismo y la producción de la enzima era de 1 mmol/l/h (Veljkovic *et al.*, 1992).

La obtención de la enzima dextransacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F fue estudiada en cultivos en lote, bajo condiciones estáticas. Los cambios en la temperatura mostraron un efecto significativo en la producción de la enzima. La máxima producción de la enzima se observó a 23°C, una temperatura de 25°C redujo la actividad enzimática en un 28% y a 20°C se redujo la actividad en un 17% (Goyal, Nigam and Katiyar, 1995).

La producción de dextransacarasa, dextrano y fructosa por fermentación en lote empleando como sustrato la sacarosa y el microorganismo *Leuconostoc mesenteroides* NRRL-B512 fue evaluada en un biorreactor empleando un volumen de medio de 1.5 dm3, estudiando el efecto de la temperatura (20 a 40 ° C), el pH (5,5 y 6,7) y la concentración

de sacarosa (10 a 120 g /l). Las condiciones óptimas para la producción de dextrano y fructosa fueron de 35 ° C y pH de 5.5. El crecimiento celular no fue inhibido por las altas concentraciones de sacarosa, pero concentraciones de sacarosa superiores a 40 g / dm3, no permitieron separar fácilmente los productos de las células microbianas. Al final de la fermentación, las concentración de dextrano fue de 8,17 g/l y de fructosa de 8.15 g / l. Igualmente encontraron que el pH de 6,7 era ideal para el crecimiento del microorganismo, pero la actividad de la enzima fue más alta a pH de 5,5 (Santos, Teixeira and Rodrigues, 2000).

En el 2003, Rodríguez *et al,* estudiaron el efecto de la concentración de fosfatos en la producción de la enzima y el crecimiento del *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F, usando 0,3 M de K_2HPO4 en lugar de 0,1M, observándose un incremento en la biomasa y de la actividad enzimática de 28 UDS/ml y una biomasa de 4,2 mg/ml (Rodrigues, Lona and Franco, 2003).

Purama y Goyal, estudiaron la producción de la enzima dextransacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL-640 ante seis variables, sacarosa, extracto de levadura, K_2HPO4, peptona, extracto de carne de res y Tween 80, para seleccionar los nutrientes que afectan significadamente la producción de la enzima. Las variables sacarosa, K_2HPO4, extracto de levadura y extracto de carne de res mostraron que afectaban significativamente la producción de dextransacarasa y se consideraron factores importantes para la optimización de la producción de la enzima (Purama and Goyal, 2008b).

En el 2009 Purama *et al*, estudiaron las condiciones de crecimiento óptimas para la producción de dextransacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-640 en rangos de temperatura de 22 a 30ºC bajo agitación y en condiciones estática, observándose una temperatura óptima para la producción de dextransacarasa de 25°C y la actividad enzimática en el cultivo en agitación fue 20% más alto que cultivo estático. La actividad dextransacarasa de *L. mesenteroides* de NRRL B-640 se comparó con *L. mesenteroides* NRRL B-512F, mostrando que la máxima actividad de dextransacarasa producida por *L. mesenteroides* NRRL B-640 a 25ºC en un cultivo con agitación fue 15% más alto que la actividad de la enzima dada por *L. mesenteroides* NRRL B-512F creciendo a 23 °C, en un

cultivo estático. La dextransacarasa producida por *L. mesenteroides* NRRL B-640 muestra una actividad enzimática máxima cuando se analiza en el rango de temperatura de 30 a 35 °C y a un pH de 5.4 (Purama and Goyal, 2009).

1.3 Purificación de la dextransacarasa

La mayoría de los estudios encontrados en la purificación de la enzima dextransacarasa son del género *Leuconostoc*, usando diferentes métodos cómo polietilenglicol por fraccionamiento, ultrafiltración y cromatografía. La producción de la dextransacarasa inducida por la presencia de sacarosa con la producción de dextrano, hace el medio más viscoso y dificulta su purificación.

1.3.1 Precipitación con polietilenglicol (PEG)

El PEG son polímeros solubles en agua, no iónicos que actúan desestabilizando los enlaces de hidrógeno de la superficie de la enzima, causando su agregación y precipitación (Bisswanger, 2011).

Se ha utilizado un sistema de concentración-purificación por extracción líquido-líquido para la purificación de la enzima dextransacarasa, agregando polietilenglicol (PM=1500), donde se forman dos fases debido a la incompatibilidad de los dos polímeros (polietilenglicol-dextrano) que termodinámicamente no son establemente solubles en la misma fase. La dextransacarasa se ubica en la fase dextrano, la enzima se encuentra en forma de complejo enzima-dextrano y los otros componentes estarán en la fase del polietilenglicol (Garibay, Ramírez and López-Munguía, 2004).

Nigam *et al*, purificaron dextransacarasa *de Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F por fase de partición usando tres etapas repetidas con PEG 6000 y PEG 400, siendo más efectivo el PEG 6000 logrando una actividad específica de 42,1 U/mg, que la obtenida de 23,8 U/mg con PEG 400 (Nigam, Goyal and Katiyar, S, 2006).

Otros investigadores purificaron la enzima dextransacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-640 del extracto libre de células por fraccionamiento empleando PEG-200, 400 y 1500. La dextransacarasa purificada al 10% (p/v) con PEG 1500 dio una actividad específica de 23 U/mg (Purama and Goyal, 2008a).

La enzima dextransacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1149 con una actividad enzimática especifica de 0,9 U/mg, se purificó por fraccionamiento con PEG 400 (33%) y PEG 1500 (15%). La purificación con el PEG 400 dio una actividad especifica de 9,2 U/mg y con PEG 1500 dio 15 U/mg (Shukla, Iliev and Goyal, 2010).

1.3.2 Cromatografía

La cromatografía es un proceso físico donde los componentes de la mezcla son separados basados en la distribución diferencial entre dos fases, estacionaria y móvil. La combinación de dos efectos, el arrastre de los componentes por la fase móvil y su retención por la fase estacionaria, con transferencia repetida de los componentes entre ambas fases, conduce a la separación por migración diferencial de los componentes. A medida que la fase móvil fluye sobre la estacionaria, los componentes se distribuyen entre ambas fases (Polo, L, 2015).

Las cromatografías se pueden clasificar de acuerdo con el estado físico de la fase móvil y estacionaria, en gas-líquido y liquido-liquido. De acuerdo con el método de contacto empleado entre las dos fases, cromatografía en columna y cromatografía en placa. Según el mecanismo de separación, de adsorción, de reparto, de cambio de ion, de exclusión y de afinidad (Gónzales, 2010).

El sobrenadante libre de células conteniendo la enzima dextransacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* B-1299 se precipitó con sulfato de amonio (80 % de saturación). El precipitado se disolvió en buffer fosfato de sodio 0,005 M (pH 5,5) y se dializó contra el mismo buffer. Una suspensión de hidroxiapatita (100 ml) se adiciono al dializado (370 ml). Se dejó en agitación por 20 minutos y se centrifugó. El precipitado se lavó con buffer fosfatos 0,01M (pH 5,5) y luego dos veces con 150 ml de buffer fosfatos 0,2 M (pH 5,5) y posteriormente con buffer 0,4 M. El extracto enzimático se dializó contra buffer fosfato 0,01 M (pH 5,5). El dializado se colocó en la columna DEAE-celulosa equilibrada con buffer fosfato 0,01 M. La columna se lavó con el buffer de equilibrio y se eluyó con el mismo buffer con concentraciones incrementadas de NaCl (gradiente lineal, 0,1-0,4 M). Las fracciones con enzima activa fueron concentradas 10 veces por ultrafiltración. Cada fracción de

enzima obtenida se dializó contra el mismo buffer. Cada dializado de enzima se aplicó a Sephadex G-75 preequilibrado con buffer fosfato 0,01 M y eluída con el mismo buffer. Las fracciones conteniendo la enzima activa fueron concentradas por ultrafiltración. Cada ultrafiltrado se colocó en una columna de DEAE-Celulosa previamente equilibrada con buffer fosfato 0,01 M (pH 5,5). Después de la adsorción la columna, se lavó con el buffer y fue eluída con el buffer conteniendo 0,2, 0,3 y 0,4 M de NaCl, encontrando dos formas de enzimas con una relativa actividad mucho más alto que el extracto inicial (Kobayashi and Matsuda, 1976).

Empleando un tratamiento con dextranasa y las cromatografías de DEAE-celulosa, cromatografía de afinidad en Sephadex G-200 y cromatografía en DEAE-Tris-acril M con el fin de obtener una muestra dextransacarasa con bajo contenido de carbohidratos (1–100 µg / mg de proteína) y alta actividad específica (90–170 U / mg de proteína). La enzima tenía dos formas de peso molecular 177 kDa y 158 kDa. La forma 177 kDa predominó en preparaciones frescas de sobrenadante de cultivo o enzima purificada, mientras que la cantidad de la forma 158 kDa aumentó durante el almacenamiento. El procedimiento de la cromatografía fue el siguiente: a 980 ml de sobrenadante libre de células con dextransacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512, se le agregó dextranasa (0,09 UI/mg) a un pH de 5,2, para hidrolizar el dextrano y luego se dializó en buffer acetato de sodio 0,02 M (pH5, 2) y 0,05 M de NaCl. Un litro del dializado fue colocado dentro de una columna de celulosa DEAE-celulosa equilibrada con el mismo buffer. La columna se lavó con 0,25 litros del buffer y luego con 1,9 Litros de acetato de sodio 0,02 M (pH5, 2), 0,2 M de NaCl. Luego se lavó con 0,5 litros de 0,02M de imidazol–HCl (pH6,7), 0,2 M de NaCl. Se realizó un gradiente lineal de NaCl (1,6L; 0,2-1,0M) por un periodo de 5 días. La fracción activa eluída de DEAE-celulosa (480 ml) se aplicó a una columna de Sephadex G-200 a 20-23 °C. La columna fue lavada con 0,1 L de 0,02 M imidazol- HCL (pH 6,7), 04 M de NaCl y luego con 0,2 L de 0,05 M imidazol- HCl (pH6,7) sin HCL y luego eluída con el mismo buffer conteniendo 3 M de urea. Posteriormente, 260 ml del eluato de urea se aplicó a una columna de DEAE-Trisacril M equilibrada con el mismo buffer de urea y fue eluída con NaCl. Debido a la afinidad de la enzima por el polímero, se ha empleado el Sephadex G-200 para su purificación (Miller, Eklund and Robyt, 1986).

1.3.3 Ultrafiltración

Es un proceso suave que permite concentrar proteínas teniendo en cuenta el tamaño de la proteína y el límite de exclusión de la membrana, minimizando la degradación de la proteína (Evans, Romero and Westoby, 2009).

La propiedad de retención de la membrana se refiere al corte del peso molecular (MWCO). Este valor se refiere al peso molecular aproximado de un soluto globular diluido, el cual es retenido por la membrana en un 90% (Schratter, 2004).

La forma de la molécula puede influir en la retención por la membrana. Por ejemplo, una molécula lineal como el DNA puede encontrar la forma de atravesar los poros de la membrana, contrario a la proteína globular del mismo peso molecular que es retenida.

Las aplicaciones de la ultrafiltración son,(Baker, W, 2004; Schratter, 2004):

- Concentrar proteínas diluidas, muestras de ADN, RNA (*Nunes et al.*, 2014).

- Elimina o intercambia sales, elimina detergentes, separa moléculas, retira material de bajo peso molecular y cambia rápidamente el entorno iónico y el pH.

- Separa moléculas de peso moleculares similares que difieren en al menos un orden de magnitud (10x). Es efectivo en la separación de filtrados libres de proteínas, separar marcadores no unidos o no incorporados al ADN o de proteínas y a los productos de purificación del PCR de la reacción de síntesis.

Al realizar una ultrafiltración se debe tener en cuenta el volumen a filtrar, el tamaño de la proteína a separar, el punto de corte de la membrana y el tamaño de poro (microfiltración). La retención de una molécula por ultrafiltración (UF) está determinada por el peso molecular, el MWCO adecuado, la forma molecular de la proteína, la carga eléctrica, concentración de la muestra, composición de la muestra y las condiciones operacionales. Las variables más comunes que disminuyen el paso de una molécula son muestras más concentradas que 1mg/ml, buffer que permite la agregación de las moléculas, presencia

de otras moléculas que incrementa la concentración de las muestras, baja presión transmembranal, adsorción a la membrana y la baja temperaturas (4°C).

Las membranas de microporos (microfiltros), son hechas de varios polímeros, generalmente con dos capas. En un lado una capa muy delgada que está en contacto con la muestra en el rango de 10-400 Angstrom ($1X10^{-6}$ a $4x10^{-5}$ mm). Debajo de esta membrana se encuentra una más delgada (50-250 µm). Las mejores membranas son inertes, no citotóxicas, y no desnaturalizan materiales biológicos, con retención confiable y buena permeabilidad al agua (Schratter, 2004) .

La mayoría de las membranas de UF consiste en estructuras fuertes (Tyvek) y sobre las cuales se encuentra una capa polimérica delgada, esta suministra las verdaderas propiedades selectivas. El MWCO (molecular Weight cut off), indica que el 90-95% de las moléculas con masa igual al punto de corte no pasarán a través de la membrana. La ultrafiltración es ideal para remover o intercambiar sales, azúcares, solventes no acuosos, proteínas, material de bajo peso molecular. La mejor alternativa para separación es la UF usando la centrifugación, resultando una muestra concentrada más fácilmente. Este procedimiento vertical utiliza tubos de centrifuga cónicos, estériles para un volumen determinado, dependiendo de la referencia. Dentro del tubo se encuentra un dispositivo (filtro) que tiene en la parte inferior una membrana de un peso molecular de corte (MWCO) de acuerdo con la referencia. El volumen de muestra es agregado en el filtro y centrifugada a un determinado tiempo y temperatura. La muestra concentrada se recupera con una pipeta del filtro (Scopes, 1982; Schratter, 2004).

1.4 Dextrano

El dextrano se encuentra en pequeñas cantidades en forma natural en los alimentos, como en la azúcar refinada, jarabe de arce, zumo de chucrut, miel y en la placa dental.

En general los dextranos son solubles en agua, dimetilsulfóxide, formamida, etilenglicol y glicerol, pero insoluble en alcoholes monohídricos, por ejemplo, metanol, etanol e isopro-nol, y también en la mayoría de las cetonas. Los dextranos lineales tienen alta solubilidad en agua, y en soluciones acuosas se comportan como fluidos newtonianos.

La solubilidad el dextrano en agua depende del patrón de enlaces ramificados. Generalmente los dextranos que están constituidos por más del 43% de enlaces ramificados α-(1- 3) son insolubles en agua. La viscosidad de la solución de dextrano depende de su concentración, temperatura, y del peso molecular. El dextrano por ser un polisacárido neutro, la viscosidad no es influenciado significativamente por los cambios en el pH o en la concentración de sal (Kothari *et al.*, 2015).

Ejemplos de dextranos con sus enlaces aislados de bacterias ácido lácticas de diferentes alimentos se describen en la Tabla 1-3.

Tabla 1- 2: Dextranos aislados de bacterias ácido lácticas de diferentes alimentos (Kothari *et al.*, 2015).

Microorganismo	Alimento	Enlace
Leuconostoc mesenteroides CMG713	Uva	α-(1→6)
Leuconostoc mesenteroides AA1	Repollo fermentado	α-(1→6)
Lactobacillus satsumensis NRRL B-59839	Agua de granos de kéfir	44% α-(1→3) y 37% α-(1→6)
Pediococcus pentosaceus CRAG3	Pepinos fermentados	75% α-(1→6) y 25% α-(1→3)
Weissella cibaria CMGDEX3	Repollo	96,6% α-(1→6) y 3,4% α-(1→3)
Weissella confusa Cab3	Repollo fermentado	97% α-(1→6) y 3% α-(1→3)
Weissella cibaria JAG8	Cáscara de manzana	93% α-(1→6) y 7% α-(1→3)

El Instituto de biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia ha estudiado un biopolímero producido por las bacterias ácido-lácticas, una cepa nativa colombiana

catalogada como GRAS. El biopolímero tiene unas propiedades fisicoquímicas y reológicas que lo harían importante en la industria química, farmacéutica y alimenticia.

Algunas de sus aplicaciones podrían ser: viscosante, estabilizante, emulsificante, formación de películas para cápsulas y para los empaques de los alimentos. Además, el aporte de fibra dietaría (Tabla 1-4), lo haría importante en los alimentos funcionales, (prebióticos), estimulando el crecimiento de microorganismos de la microflora intestinal (bifidobacterias).

Al biopolímero BILAC, se le realizaron ensayos toxicológicos, según las normas técnicas de la OECD (Guideline for the testing of chemicals), no presentándose ninguna sintomatología de enfermedad con respecto a los controles.

Tabla 1- 3: Análisis nutricional del biopolímero BILAC (Escobar, M, 2012).

Componentes	%	Métodos de análisis
Agua	9,96	A.O.A.C. 932.12 (Gravimetría)
Proteína	1,42	A.O.A.C. 920.152 (Kjeldahl)
Minerales	1,51	A.O.A.C. 940.26
Fibra dietaría total (FDT)	86,17	A.O.A.C. 985.29
Fibra dietaría Insoluble (FDI)	1,37	A.O.A.C. 1991.42
Fibra dietaría soluble (FDS)	84,79	FDT-FDI= FDS

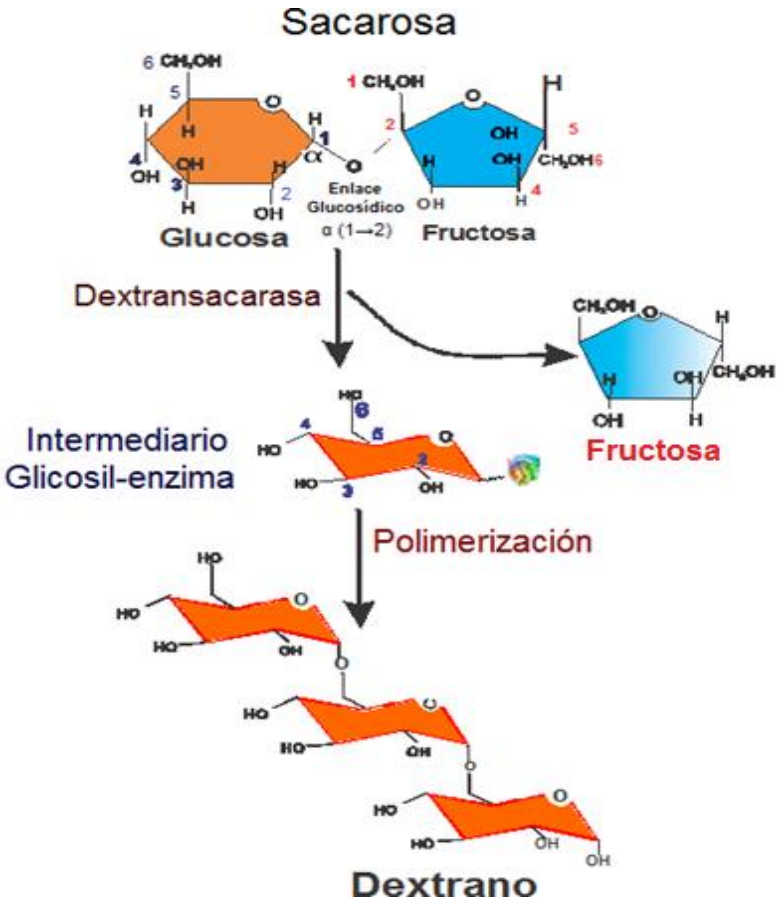
Realizados por Nutrianálisis.

El polímero BILAC tiene un peso molecular promedio de 1000 kDa, es hidrosoluble, compatible con biopolímeros solubles en agua o hidrocoloides grado alimenticio como la pectina cítrica, goma guar, goma gellan, y tragaconta. Además, forma mezclas homogéneas con el glicerol, manitol, sorbitol, sacarosa, glucosa y fructosa. El biopolímero es estable a diferentes condiciones de pH, tanto ácidos como básicos. La estabilidad térmica es superior a otros polímeros solubles hasta una temperatura de 180 °C.

1.4.1 Biosíntesis de dextrano

La enzima dextransacarasa sintetiza dextrano a partir de sacarosa con la liberación concomitante de fructosa por un mecanismo de doble desplazamiento. En la primera etapa de la reacción de doble desplazamiento, la unión glucosídica α-(1→ 2) de la sacarosa es separada con la liberación de fructosa y se forma un intermediario covalente de glicosíl-enzima, en el cual el glucosíl está covalentemente unido al nucleófilo catalítico mediante un enlace β- glucosídico. En la segunda etapa de la reacción, la fracción de unión covalente se transfiere al extremo no reductor aceptor del azúcar de una cadena de crecimiento del glucano con la formación de un enlace α- glicosídico (Kothari *et al.*, 2015). Ver Figura1-3.

Figura 1- 3: Producción del dextrano por la enzima dextransacarasa (Kothari *et al.*, 2015).



La biosíntesis de dextrano ocurre fuera de la célula, sin la intervención de un precursor activado o un cofactor. El mecanismo de la síntesis de dextrano todavía no es muy claro, hay posiblemente dos mecanismos generales para la biosíntesis de polisacáridos dextrano de peso molecular mayor a 200 KDa. En la primera, la unidad monómera es adicionada secuencialmente a la terminación no reductora de una cadena en crecimiento de un donador de alta energía. En el segundo, las unidades monómeras o repetidas son adicionadas secuencialmente a la terminación reductora por inserción entre un transportador y la cadena en crecimiento. La parte lineal del polímero dextrano, resulta de la condensación lineal de unidades de D-glucopiranosidos por enlace glicosídicos α-(1-6), mientras que la parte ramificada resulta de enlaces α-(1→3), α-(1→2), o α-(1→4). La presencia de azúcares de bajo peso molecular (aceptores) en la mezcla de reacción, evita el crecimiento en la cadena de polímeros, produciendo como resultado oligosacáridos (Dols, Remaud and Monsan, 1997).

En el caso del dextrano sintetizado por la dextransacarasa de *L. mesenteriodes* B512 F, se realiza por adición de unidades de glucosa a la terminación reductora de la cadena en crecimiento. Se cree que la enzima forma un complejo covalente con la terminación reductora de la cadena de dextrano y la unidad glucosil de la sacarosa forma un intermediario covalente con la enzima, el cual se inserta entre la enzima y el reductor extremo de la cadena de dextrano (Robyt, Kimble and Walseth, 1974).

La síntesis de dextrano es posible usando preparaciones de enzimas libres de células. La energía requerida para la condensación de residuos D-glucopiranosil es suministrada por la hidrólisis del enlace osídico de la glucosa- fructuosa de la molécula de sacarosa. Esta energía es conservada por la formación del complejo D-glucosil-enzima. El mecanismo de acción descrito por Roby y colaboradores involucra dos sitios idénticos de fijación de residuos de D-glucosil, en el cual este último es transferido al extremo reductor de la cadena de dextrano en crecimiento. La cadena permanece covalentemente unida a la enzima. Durante la síntesis de polímeros, la enzima forma un complejo enzimáticamente activo con glucosa y dextrano. La fructuosa es un aceptor débil, pero puede actuar como un aceptor para los residuos de D-glucosil, resultando la formación de leucrosa, α-D-glucopiranósido-(1→5)-fructopiranósido. La maltosa es un aceptor eficiente causando la liberación de pequeños oligodextranos (Monsan *et al.*, 1987).

1.5 Inmovilización y métodos

Las enzimas son biocatalizadores con gran proyección como catalizadores en procesos industriales con alta actividad en virtud de las condiciones medioambientales, alta selectividad y especificidad. Sin embargo, las enzimas tienen también algunas limitaciones que pueden impedir su implementación industrial como la disponibilidad del biocatalizador y estabilidad operacional (Schoemaker, Mink and Wubbolts, 2003).

Las enzimas son moléculas solubles en agua que necesitan ser separadas de la reacción para ser reutilizadas para mejorar la economía del proceso y para facilitar el control en el reactor. Esto se puede lograr inmovilizando la enzima (Barbosa *et al.*, 2015).

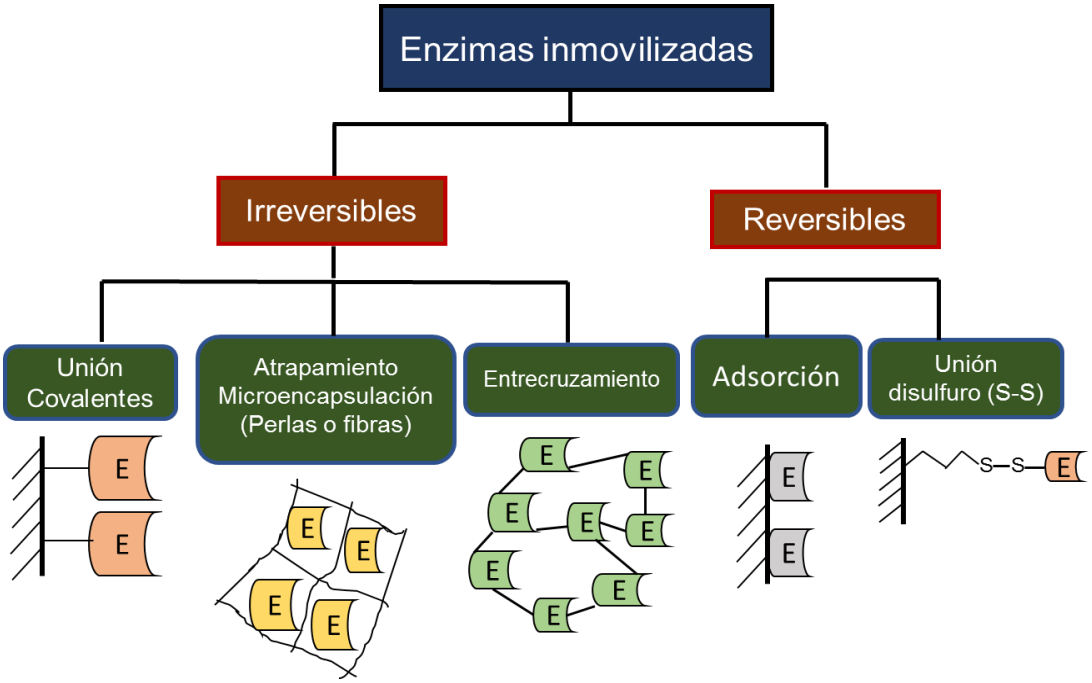
En comparación con la forma libre de la enzima, las enzimas inmovilizadas son generalmente más estables y fáciles de manejar. Los productos de reacción no están contaminados con la enzima, siendo útiles en las industrias alimentarias y farmacéuticas. Además, la inmovilización también mejora muchas propiedades de las enzimas tales como el rendimiento en disolventes orgánicos, tolerancia a pH, selectividad, estabilidad térmica o la estabilidad funcional (Polizzi *et al.*, 2007).

Algunas enzimas inmovilizadas presentaron una mejor actividad que la enzima nativa como por ejemplo la epóxido hidrolasa adsorbida en celulosa- DEAE por unión iónica fue dos veces más activa que la enzima no inmovilizada (Ahmad and Sardar, 2015). El complejo lípido-lipasa atrapada en una matriz de gel invinil-2 pirrolidona fue 50 veces más activa que la enzima nativa (Goto, Hatanaka and Goto, 2005).

La inmovilización permite la recuperación de las enzimas y la separación del biocatalizador del producto, permitiendo los procesos continuos y evitando que la proteína y su actividad sea llevada a pasos subsiguientes del proceso. A pesar de la larga historia y evidentes ventajas de la inmovilización enzimática, se estima que sólo el 20 % de los procesos biocatalíticos implican enzimas inmovilizadas En los últimos años, un número interesante de nuevos métodos han sido reportado y sus aplicaciones han sido patentados lo que indica que la inmovilización de la enzima ha entrado en una nueva fase de interés científico (Brady and Jordaan, 2009) .

La selección de un método de inmovilización es muy importante para evitar la pérdida de la actividad enzimática. El sitio activo puede ser protegido por la unión de grupos protectores que se puede retirar sin ninguna pérdida de actividad enzimática. En algunos casos, esta función de protección puede ser cumplida por un sustrato o un inhibidor competitivo de la enzima. Los procedimientos más comunes de inmovilización de enzimas son la adsorción, unión covalente, atrapamiento y reticulación (entrecruzamiento). (Ahmad and Sardar, 2015). En la Figura 1-4, se pueden observar los diferentes tipos de inmovilización (Brena, Pombo and Viera, 2013).

Figura 1- 4: Métodos de inmovilización enzimática (Brena, Pombo and Viera, 2013).



1.5.1 Adsorción

Es un método muy simple, no especifico, que se basa principalmente en la adsorción física o unión iónica. En la adsorción física, las enzimas se unen a la matriz a través de enlaces de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, interacciones hidrófobas o interacciones tipo iónicas entre la enzima y el soporte. La naturaleza de las fuerzas implicadas no es covalente, resultando en una inmovilización que puede ser revertida por cambiar las condiciones que influyen en la fuerza de la interacción (pH, fuerza iónica, la temperatura,

o la polaridad del disolvente). La inmovilización por adsorción es suave, fácil de realizar y por lo general conserva la actividad catalítica de la enzima. Tales métodos son por lo tanto económicamente atractivos, pero pueden sufrir problemas tales como pérdidas de la enzima de la matriz, cuando las interacciones son muy débiles. La adsorción es un método atractivo por razones económicas, simplemente porque cuando la actividad enzimática baja, el soporte puede regenerarse y volver a ser cargada con la enzima fresca. El precio del soporte es a menudo un factor importante en el costo global de biocatalizador. La inmovilización reversible de las enzimas es particularmente importante para la inmovilización de enzimas lábiles y para aplicaciones en sistemas bioanalíticos. Las propiedades ideales de un soporte incluyen la resistencia física que minimiza la pérdida de la enzima retenida, evitando la modificación química y el daño de la enzima, teniendo cuidado que las fuerzas de unión no se debiliten durante los cambios inusuales en el pH o fuerza iónica (Datta, Christena and Rajaram, 2013; Homaei *et al.*, 2013).

El Sephadex (Separation Pharmacia dextran), es un gel de dextrano utilizado en inmovilizaciones enzimáticas debido a su hidrofilicidad que favorece la actividad de muchas enzimas. El gel está constituido por moléculas de glucosa entrecruzados con epiclorhidrína dando una red tridimensional que tiene grupos iónicos funcionales unidos por enlaces éter a unidades de glucosa y se presenta en forma de gotas. Algunos investigadores como Doman Kim y Jhon F, Robyt emplearon Sephadex G-100 y G-200 para inmovilizar la enzima dextransacarasa, la cual fue afectada por la presencia de dextrano (0,1% o más) y por el grado de reticulación del Sephadex, por ejemplo el Sephadex G-15 mostró una baja adsorción (Kim and Robyt, 1994b).

Kim y Robyt reportaron el desarrollo de una cepa mutante de *L. mesenteriodes* que no requiere sacarosa en el medio de cultivo. Para la producción de la enzima, se cultivó el microorganismo *L. mesenteriodes* mutante constitutiva en medio de glucosa para la producción de leucrosa. La enzima fue concentrada por ultrafiltración y libre del polímero dextrano. Las matrices a base de dextrano G-25, G-100 y G-200 y Superdex 200, fueron mezclados con el concentrado enzimático y dejado en agitación suave 3 horas a 4° C. La enzima no unida en la mezcla fue removida por filtración y el biocatalizador fue lavado con buffer acetato de sodio 20 mM (pH 5,2) conteniendo $CaCl_2$ 1mM. La actividad de la

dextransacarasa fue determinada midiendo la cantidad de fructosa liberada de la sacarosa. El óptimo pH de la enzima inmovilizada fue de 5,2 y su óptima temperatura de 30 ° C. La inmovilización de la enzima en Sephadex G-200 dio alta isoterma de adsorción con la dextransacarasa debido al tamaño de los poros y al área de superficie más grande que el Sephadex G-25, permitiendo que las moléculas penetraran en la matriz. La enzima inmovilizada retuvo más del 80 % de su actividad específica, mostrando una buena estabilidad y retuvo su actividad por 15 días (Han, Kang and Robyt, 2005).

1.5.2 Formación de enlaces disulfuro

Este enfoque de inmovilización enzimática implica la formación de enlaces de disulfuro (-S-S-) con el soporte. Las enzimas que contienen grupos de tiol (SH) no esenciales expuestos pueden inmovilizarse en soportes reactivos al tiol, provistos de disulfuros reactivos u óxidos de disulfuro en condiciones suaves. La gran ventaja potencial es la reversibilidad de los enlaces formados entre la fase sólida activada y la enzima tiol, porque la proteína ligada puede ser liberada con un exceso de tiol de bajo peso molecular (por ejemplo, ditiotreitol [TDT]). Además, la reactividad de los grupos tiol puede ser regulada cambiando el pH. Esto es de particular interés cuando la enzima se degrada mucho más rápido que el adsorbente que puede ser nuevamente recargado. La posibilidad de reutilizar el soporte polimérico tras la inactivación de la enzima puede ser de interés para el uso práctico de las enzimas inmovilizadas en procesos a gran escala industrial (Ovsejevi and Batista -Viera, 2013).

1.5.3 Atrapamiento y entrecruzamiento

El atrapamiento se define como el movimiento restringido de las enzimas en un gel poroso, manteniéndolos como moléculas libres en solución. En la inmovilización por atrapamiento las enzimas son mantenidas dentro de geles o fibras. Es un método conveniente para ser usado en procesos que implican sustratos de bajo peso molecular y productos. Sin embargo, la dificultad que tienen las moléculas grandes al acercarse a los sitios catalíticos de las enzimas atrapadas impide el uso de enzimas con sustratos de alto peso molecular. Por ello, el uso práctico de estos métodos está restringido por las limitaciones de transferencia de masa a través de membranas o geles (Brena, Pombo and Viera, 2013).

Los procesos de atrapamiento pueden ser por enjaulamiento puramente físico o involucrar unión covalente. Las enzimas han sido atrapadas en polímeros naturales como agar, agarosa y la gelatina a través de una polimerización o en alginato y carragenina por gelificación ionotrópicos. Un número de polímeros sintéticos han sido investigados como el hidrogel alcohol polivinílico y la poliacrilamida (Ahmad and Sardar, 2015).

El entrecruzamiento implica la unión de biocatalizador a reactivos multifuncionales o ligandos, formándose agregados insolubles de peso moleculares altos. La reticulación o entrecruzamiento es un proceso relativamente simple y no utiliza ningún tipo de matriz, siendo por lo general gelatinosas y no particularmente firmes. El entrecruzamiento ayuda a reducir las fugas de enzimas ya inmovilizada por adsorción. La condición para una exitosa inmovilización de adsorción de la enzima sobre el soporte solido es la existencia de grupos funcionales específicos sobre la superficie de la enzima y el soporte, dando lugar a interacciones suficientemente fuertes para su unión (adsorción). El agente modificador debe tener al menos dos grupos reactivos en su molécula, uno que permite fijarse al soporte y el otro interactuar físicamente con la enzima. El compuesto que cumplen estas condiciones son los carbonílicos bifuncionales como el glutaraldehído. Además, este contiene dos grupos reactivos aldehídos, siendo usado como desinfectante y preservante. La presencia de 5 átomos de carbono sirve como un espaciador para las enzimas, haciendo más fácil el acceso del sitio activo de la enzima al sustrato. El reactivo aparentemente más comúnmente utilizado para entrecruzamiento es el glutaraldehído y ha sido utilizado ampliamente debido a su bajo costo, alta eficiencia y estabilidad (Jesionowski *et al.*, 2014).

Las enzimas o las células han sido reticuladas en presencia de una proteína inerte como gelatina, albúmina, colágeno y se puede aplicar a cualquiera enzima o célula. Las principales desventajas son las pérdidas de actividad indeseables que pueden surgir, la reacción de reticulación no se controla fácilmente y es muy difícil obtener grandes agregados enzimáticos con alta retención de actividad (Ahmad and Sardar, 2015) .

Un método de inmovilización son los agregados enzimáticos reticulados (CLEAs), producidos mediante la simple precipitación de la enzima en una solución acuosa,

agregados físicos de proteínas, por la adición de sales o solventes orgánicos miscibles en agua o polímeros no iónicos. Estos agregados de proteínas se mantienen unidas mediante unión no covalente sin perturbación de su estructura terciaria, que no desnaturaliza la enzima. Después del entrecruzamiento se mantiene su estructura insoluble y su actividad catalítica. Esta inmovilización ha resultado ser muy eficaz, barata y puede fácilmente ser reutilizada, exhibiendo una actividad y rendimiento satisfactorio (Sheldom, A, 2007).

1.5.4 La unión covalente

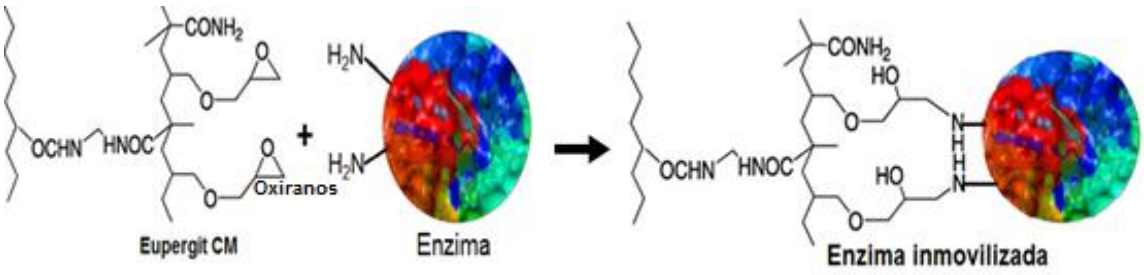
Es uno de los métodos más empleados debido a la unión estable entre la enzima y el soporte, impidiéndose la liberación de la enzima durante su uso. Para lograr niveles altos de actividad, los residuos de aminoácidos esenciales para la actividad catalítica deben no involucrarse en la unión covalente con el soporte, lo cual es difícil. Las reacciones más frecuentes involucran las siguientes cadenas laterales de los aminoácidos: lisina (grupo ε-amino), cisteína (grupo tiol), ácido aspártico y ácido glutámico (grupo carboxílico) (Datta, Christena and Rajaram, 2013).

La unión covalente de la enzima con el soporte se produce debido a la cadena de los aminoácidos laterales como arginina, ácido aspártico, histidina y el grado de reactividad de los diferentes grupos funcionales como imidazol, indolil, hidroxilo fenólico. Algunas veces, los grupos funcionales del material del soporte son activados por ciertos reactivos y luego la enzima se une al material del soporte a través de enlaces covalentes. La inmovilización con glutaraldehído ocurre: inmovilizando la enzima en soportes previamente activados con glutaraldehído o tratando con glutaraldehído la proteína absorbidos sobre un soporte con grupos aminos primarios. El bromuro de cianógeno (CNBr) - agarosa y CNBr - Sepharose son activados con hidratos de carbono que contiene la fracción y glutaraldehído, que imparte termo estabilidad a las enzimas unidas covalentemente. La unión entre el soporte y la enzima se puede lograr ya sea por vinculación directa entre los componentes o a través de un enlace intercalado de diferentes longitudes (espaciador). La molécula espacial da un mayor grado de movilidad al biocatalizador haciendo que su actividad pueda ser mejor cuando se compara con la de biocatalizador unido directamente (Betancor *et al.*, 2007; Datta, Christena and Rajaram, 2013; Ahmad and Sardar, 2015).

La aplicación de geles y otros matrices para ser utilizados en la inmovilización ha sido complicada debido a las pobres propiedades mecánicas que llevan a su ruptura. En años recientes se ha estado trabajando en mejorar las propiedades mecánicas mediante copolimerización de los monómeros hidrofílicos fuertes con monómeros del mismo tipo N-sustituido (metilacrilamida), las cuales son hidrofóbicas (Ulbrich and Kopecék, 1979).

Un soporte comercial con radicales epóxidos disponible de Röhm Pharma Polymers (Piscataway, NJ), bajo el nombre de Eupergit ha ganado atención para inmovilizar enzimas. Las resinas de Eupergit son ampliamente utilizadas como soportes para la inmovilización covalente, son un entrecruzamiento de copolímeros de macroporos de metacrilamida y grupos oxiranos. Eupergit CM tiene un tamaño de partícula de 50-300 µm y un tamaño de poros mediano de 10 a 100 nm, con un promedio de 50 nm (0,05 µm). Estas resinas son altamente hidrofílicas y estables, química y mecánicamente, en un rango de pH de 0 a 14, y no se hinchan o encogen incluso en condiciones drásticas. El soporte se une a través de la reacción de sus grupos oxiranos, a pH neutro o alcalino, con los grupos amino libres de la enzima para formar uniones covalentes, la cuales son bastante estables en un rango de pH de 1 a 12. Las moléculas enzimáticas pueden unirse covalentemente a los grupos oxiranos con grupos aminos, sulfidril o carboxil, (Novick and Rozzell, 2005; Sheldom, A, 2007), Ver figura 1-5.

Figura 1- 5: Inmovilización de la enzima al Eupergit a través de grupos aminos libres (Novick and Rozzell, 2005).



La inmovilización de la lipasa de *Pseudomonas fluorescens* mediante enlaces covalentes sobre soportes activados, oxiranos (Eupergit CM) con un tamaño de partículas de 130-280 *µ*m y de poros de 500 Å (ángstroms), se realizó utilizando Eupergit CM (400mg) con 200

µl de lipasa en buffer fosfatos (0,1 M pH9,0) a 25 °C con agitación suave por 24 horas. Se filtró y lavó con buffer fosfato (0,1 M pH9,0) y se almacenó 4 °C. La enzima lipasa inmovilizada mostró una alta estabilidad durante el almacenamiento, y retuvo su actividad inicial durante 20 días (Aslan *et al.*, 2014).

1.6 Inmovilización de dextransacarasa

La producción fácil y económica de dextrano y oligosacáridos requiere el uso de dextransacarasa inmovilizada por su costo de producción, permitiendo mantener la estabilidad estructural de la enzima durante su reacción y control del proceso. Además su reutilización en forma continua, facilitaría su uso para ser empleada a nivel industrial a gran escale debido a sus variadas aplicaciones (Bhavani and Nisha, 2010).

La dextransacarasa ha sido inmovilizada covalentemente en diferentes soportes como sílice porosa, dando bajo rendimiento, debido al dextrano que cubre la enzima y dificulta su inmovilización. La presencia de dextrano impide las reacciones entre los residuos de aminoácidos de la enzima y el soporte. Hay pocos informes sobre los residuos de aminoácidos presentes en el sitio activo. Dos grupos funcionales de aminoácidos están implicados en el mecanismo de la transferencia de glucosil de la sacarosa. Al estudiar el sito activo de la dextransacarasa de *Streptococcus sobrinus* encontraron un péptido con aspartato unido covalentemente al grupo glicosil. Modificaciones químicas utilizando pirocarbonato de dietilo demostró que los dos residuos esenciales de histidina están presentes en el sitio activo. Investigadores propusieron que el nucleófilo del grupo carboxilato del ácido aspártico estabiliza el ion carbonio en equilibrio con el complejo covalente glucosil-enzima. Los grupos de imidazolio de los residuos de histidina donan protones a las fracciones de D-fructosil y los grupos de imidazol resultantes, facilitan la formación del enlace glucosídico α-(1-6). Estudios preliminares, realizando modificaciones de la dextransacarasa con piridoxal 5'-fosfato demostraron que los residuos de lisina son esenciales para la actividad enzimática (Goyal and Katiyar, 1998; Alcalde *et al.*, 1999; Parlak, Ustek and Tanriseven, 2013).

Hay dos problemas que afectan la inmovilización covalente de la dextransacarasa, la enzima se inactiva durante la inmovilización por que se producen modificaciones estructurales en la proteína, reduciendo la eficacia catalítica de la enzima y el dextrano

asociado a la enzima limita el acceso al centro activo de la enzima, reduciendo así su actividad. Esto puede ser ocasionado por efectos difusionales o de transferencia de masa alrededor del biocatalizador en una solución de sustrato, se forma una película de líquido estático de espesor variable en función de la agitación del medio. El sustrato debe atravesar por difusión molecular esta película para llegar al sitio activo de la enzima (Ristoff, 2013).

Tariseven y Dogan, inmovilizaron dextransacarasa de *L. mesenteriodes* B-512 FM en fibras de alginato y en perlas de alginato, encontrándose mejores resultados con la fibra. La inmovilización de dextransacarasa en alginato sólo se puede usar para la producción de oligosacáridos, debido que el dextrano de alto peso molecular queda en el interior de las perlas y se quiebran (Tanriseven and Doğan, 2002).

Investigadores inmovilizaron la DS de *L. mesenteriodes* en perlas de alginato observando alta estabilidad operacional con la dextransacarasa inmovilizada que estaba reticulada con glutaraldehído, obteniendo mejores resultados con la dextransacarasa reticulada al 10%. El grado de conversión de la sacarosa fue inicialmente del 90% y luego disminuyó hasta estabilizarse entre el 60-70% (en el sexto a decimo lote). El producto final contenía aproximadamente 55-60% de isomaltosa, 20% de glucosa, isomaltotriosa, isomaltotetraosa y solamente se detectaron trazas de leucrosa (Kubik, Sikora and Bielecki, 2004).

La dextransacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* B-512F fue inmovilizada sobre soportes de Eupergit C y Eupergit C 250L. Antes de la inmovilización, la enzima dextransacarasa fue tratada con dextranasa fúngica de *Penicillium sp* (500 U/mg de proteína), para eliminar la capa de dextrano que cubre la superficie de la enzima, aumentando así la accesibilidad de los grupos reactivos de la enzima a los centros epóxidos del soporte. Para prevenir la inactivación de la enzima, la inmovilización se llevó a cabo a un pH de 5,4 de máxima actividad de la enzima. El Eupergit C se une a las proteínas a través de sus grupos epóxidos que puede reaccionar con diferentes nucleófilos en la proteína en función del pH: neutro o ligeramente alcalino pH con los grupos tioles, a pH > 9 con los grupos aminos, a pH > 11 con los grupos fenólicos de tirosinas y a pH

ligeramente ácido con grupos carboxílicos. A pH de 5,4 la unión al soporte tuvo lugar a través de los grupos carboxílicos de la enzima. A partir de las isotermas de nitrógeno y del análisis porosimétricos de mercurio se determinó en los soportes el volumen total de los poros y el tamaño de poros. El volumen total de poros de Eupergit C 250L (1.89 mL/g) es sustancialmente más alto que el de Eupergit C (0,06 mL/g). El bajo volumen de los poros y el diámetro de Eupergit C sugieren que con este soporte la enzima sólo puede unirse a la superficie externa de las partículas. Por el contrario, el alto volumen y el diámetro de los poros de Eupergit C 250L indican que la enzima después del tratamiento con dextranasa es capaz de difundirse en la matriz. La máxima actividad recuperada en la inmovilización con el Eupergit 250L fue del 22% y una máxima actividad específica de 710 U/g biocatalizador. La actividad específica con el Eupergit C fue de 226 U/g biocatalizador. Al realizar una rápida inactivación parcial, la dextransacarasa inmovilizado en Eupergit C 250L mantuvo más del 40% de la actividad inicial durante dos días (Gómez de Segura *et al.*, 2004).

Otros investigadores inmovilizaron la enzima sobre membranas SPG (fibra de vidrio huecas porosas) con diferente diámetro de poros. Los diámetros de los poros estaban en promedio entre 500 a 2000 nm. Una solución de dextransacarasa (Sigma), fue pasada por la membrana a una velocidad de 20 mL/h y a temperatura ambiente. La cantidad de DS inmovilizada fue constante e independiente del diámetro de los poros. La enzima interactúa con los grupos silanol de la superficie de la membrana por interacciones hidrofílicas. Al pasar a través de la membrana buffer y agua pura, no se detectó en el filtrado la presencia de enzima, indicando que la enzima se inmovilizó fuertemente a la membrana. Una solución de sacarosa fue permeada a través de la membrana con la enzima inmovilizada a una velocidad de 300 $h^{-}1$, la cantidad de enzima inmovilizada en las membranas SPG_{500} fue de 16 U/g y de dextrano producido de 38,7 mg/g (Kawakita *et al.*, 2009).

La dextransacarasa de *Leuconostoc mesenteriodes* y la dextranasa de *Penicillium lilacinum* fueron co-inmovilizadas y usadas para la producción de isomaltooligosacáridos a partir de sacarosa. Inicialmente se inmovilizó covalentemente 0,1 ml de dextranasa (63UI/ml) en buffer fosfatos (5 ml, 1.0 M, pH 5.3) con 200 mg de Eupergit. Luego se co-inmovilizó la dextranasa y dextransacarasa en capsulas de alginato. Se preparó una solución de dextransacarasa (2 ml, 32.4 UI), dextranasa soluble (0.1 ml, 6.3 UI) o

dextranasa preinmovilizada en Eupergit C (200mg), almidón soluble (2 g), $CaCl_2$ (0.1g) y buffer acetato de calcio (3 ml,25 mM, pH 5.4) La solución se coloca en una jeringa con una aguja de 1mm de diámetro y se dejó caer gotas en una solución de alginato de sodio al 1%. Se realizó una co-inmovilización de la dextranasa y dextransacarasa en perlas de alginato. La dextransacarasa (2ml, 32.4UI) y dextranasa preinmovilizada en Eupergit C (200 mg) se mezclan con una solución de alginato (2%). Se agrega en una jeringa y deja caer las gotas en una solución de $CaCl_2$ al 2% en solución buffer de acetato de calcio (25 mM, pH 5.4). Se co-inmovilizó la dextranasa y dextransacarasa en fibras de alginato. Una solución de dextransacarasa (2ml, 2.4 UI), dextranasa preinmovilizada en Eupergit C (200mg), alginato (0.25g), glicerol 4ml, buffer acetato de sodio (1 ml, 25 mM, pH 5.4), se pasa por bombeo a una solución de $CaCl_2$ al 2%. La co-inmovilización en capsulas de alginato con almidón soluble resultó en un alto rendimiento de inmovilización (71%) y las enzimas retuvieron su actividad durante 20 ensayos repetidos y durante un mes en almacenamiento a 4°C. La co-inmovilización en fibras y perlas de alginato resultó en un alto rendimiento de inmovilización de 70 y 64% respectivamente, pero la actividad enzimática decreció después de un mes en almacenamiento a 4ºC (Ölçer and Tanriseven, 2010).

Los problemas difusionales de la inmovilización covalente de la dextransacarasa por el dextrano de la cepa B-512F (1527 aminoácidos) fue solucionado empleando la bioingeniería para truncar (eliminar) la región de unión al glucano. Se eliminó en ambas terminaciones de la enzima, el aminoácido 284, N terminal y el 409, C terminal y se fusiono con el glutatión S-transferasa (GST: 25 kDa). Luego se inmovilizó la enzima en Eupergit C250L. La nueva dextransacarasa producida fue totalmente activa, lo que demuestra que el truncamiento y la GST no tuvo efectos negativos sobre la actividad de la enzima. Eliminación del sitio de unión al glucano y la adición de varios residuos de aminoácidos permitió la reacción con los grupos epóxidos del soporte, dando lugar al 100% de inmovilización y 83,3% rendimiento en su actividad. La enzima no mostró disminución de su actividad durante 15 reacciones por lote y retuvo su actividad inicial durante el almacenamiento a 4°C durante 35 días (Parlak, Ustek and Tanriseven, 2013).

1.7 Enzimas inmovilizadas empleadas en los alimentos.

En el 2008, el mercado de enzimas industriales fue de 2,1 billones, cubriendo una amplia variedad de aplicaciones que van desde los alimentos y bebidas hasta en diagnóstico, detergentes, alimentos para animales y biocombustibles renovables. La demanda mundial de enzimas industriales aumentará en 4,5% (1,9 billones) para el 2021, representando el 21% en la industria de alimentos y bebidas (DiCosimo *et al.*, 2013). El mercado es altamente competitivo y altamente sensible a los costos de producción (Patel, K, Singhania, R and Pandey, 2017; Guerrand, 2018).

La mayoría de las enzimas carecen de propiedades adecuadas que restringen su uso en muchos procesos en la industria alimenticia, como una alta estabilidad y actividad en condiciones de reacciones adecuadas, por ejemplo: pH, temperaturas extremas, presencia de disolventes y estrés mecánico; así como su reutilización y su fácil separación del producto final. Con el fin de mejorar la actividad y estabilidad de las enzimas, se han elaborado biocatalizadores en los que se modifica la selectividad por el sustrato y se aumenta su capacidad operacional, como en la industria de lácteos y bebidas (Garcia, G *et al.*, 2011; DiCosimo *et al.*, 2013).

La enzima inmovilizada más exitosamente usada a gran escala comercial en la industria de los alimentos es la glucosa isomerasa que convierte la D-glucosa a D- fructosa produciendo jarabe de maíz con alta cantidad de fructosa (HFCS) (Jensen, Vi and Rugh, 1987).

Otra aplicación industrial es la producción de jarabe de lactosuero empleando Beta-galactosidasa (Harju, Kallioinen and Tossavainen, 2012) y la producción de L-aminoácidos por la aminoacilasa (Chibata *et al.*, 1976).

Las peptidasas de tomate se inmovilizaron por afinidad de adsorción sobre Con A-Seralose 4B mostrando mejor estabilidad térmica, química, de almacenamiento y de reutilización para la obtención de ácido poligalacturónico en comparación a la enzima libre (Sardar and Gupta, 2005).

Los CLEAs (agregados enzimáticos entrecruzados) ha sido utilizada en el área de los alimentos con la tripsina (Chen *et al.*, 2006) gluco-amilasa, lactasa, levansucarasa, lipasa, celulasa, glucosa isomerasa y naranginasa (Fernandes, 2010; Agyei, Shanbhag and He, 2015; Li *et al.*, 2015).

La inmovilización covalente ha sido usado para la elaboración de quesos, inmovilizando una proteasa vegetal, la cardiosina A (extraída de flores de cardo), mostrando una buena estabilidad y no sufriendo inactivación térmica a 55 °C (Lamas *et al.*, 2001).

La α-L-rhamnopiranosidasa (Rha) de *Aspergillus niger* ha sido empleada en la industria vinícola para la aromatización de los vinos. Inicialmente se intentó adsorberla en soportes de quitina y quitosano usando glutaraldehído (GA), el cual une grupos aminos primarios de la enzima con grupos aminos de la quitina, como agente entrecruzante. Sin embargo, se inactivo la enzima y se perdió gradualmente del soporte, posiblemente debido al bloqueo de los grupos aminos de la enzima. Posteriormente se usó una combinación de succinimida (NHS) y 1- etil1-3-(3-dimitilaminopropil) carbodiimida (EDC). El grupo carboxil libre de la enzima se unió covalentemente en lugar del grupo amino primario dando como resultado similares parámetros cinéticos de la enzima libre y reduciendo su especificidad a los monoterpenoles terciarios, aumentando las propiedades aromáticas del vino (Spagna *et al.*, 2001).

1.8 Aplicaciones de las enzimas inmovilizadas

1.8.1 Hidrolisis enzimática de la lactosa

La β- Galactosidasa (β- Gal) es una hidrolasa que cataliza la conversión de la lactosa en glucosa y galactosa. La enzima es usada en la preparación de productos alimenticios libres de lactosa para las personas que tiene intolerancia a la lactosa, ayudando a la digestibilidad, solubilidad, y dulzura de los productos lácteos. El rendimiento de la actividad de la β-galactosidasa de *Aspergillus oryzae* inmovilizada en Celite 545 en capas de concanavalina A y reticulada con glutaraldehído al 0,5% (v / v) fue del 71%. La enzima reticulada exhibió un 78% de actividad después de 2 meses de almacenamiento, mientras que la enzima soluble retuvo solo un 40% de actividad en condiciones similares de

almacenamiento. Al comparar la enzima β- Gal absorbida, la enzima soluble y la entrecruzada, la última mostró una estabilidad del 90% después de un mes de almacenamiento a 4°C y mejor reciclabilidad (71% de actividad retenida después de reciclarse 7 veces) (Ansari, S and Husain, 2012).

La β- Gal de *Kluyveromyces fragilis* fue inmovilizada en quitosano coagulada con KOH y activada con glutaraldehído para la hidrólisis de la lactosa en leche entera empleando un sistema discontinuo. A temperaturas de 20 y 40 °C , la enzima inmovilizada fue de tres a cinco veces más estable que la enzima soluble, reteniendo el 80 % de la actividad inicial después de tres meses de almacenamiento (Vieira *et al.*, 2013).

1.8.2 Hidrolisis de proteínas de la leche usando enzimas inmovilizadas.

En la industria láctea, la hidrólisis enzimática de proteínas ha sido empleada para mejorar las propiedades funcionales, nutricionales y fisiológicas de las proteínas alimenticias sin comprometer su valor nutricional. En los alimentos se han descrito tres grados de hidrolisis, según su aplicación. El primero es la hidrólisis limitada, donde se presentan cambios funcionales, como capacidad de retención de agua y grasa, capacidad de emulsión, capacidad espumante y su estabilidad. Segundo, la hidrolisis intermedia que mejora la textura de los alimentos y sus aromas. Tercero, la hidrolisis extensiva que da como resultado productos con propiedades fisiológicas que se utilizan en suplementos o ingredientes en los alimentos. Muchas proteínas de la leche poseen propiedades biológicas específicas que hacen que estos componentes sean ingredientes potenciales de alimentos que promueven la salud. Se está centrando la atención en los péptidos fisiológicamente activos derivados de las proteínas de la leche (Agyei, Shanbhag and He, 2015).

1.8.3 Hidrolizado de proteínas para lactantes.

La predigestión de las proteínas de los alimentos mejora la absorción intestinal y su disponibilidad. Las proteínas hidrolizadas empleadas en formulaciones para lactantes deben ser hipoalergénicas de sabor aceptable y fácil absorción. Esto se logra cuando los hidrolizados están compuestos de péptidos con dos a seis aminoácidos. A partir de un extracto en agua de harina de soya (0,8-1.2%) y precipitación ácida (pH 5,0) y empleando

la tripsina inmovilizada sobre una resina de intercambio aniónico GM 201, se obtuvo proteínas de soya con bajos residuos de inhibidores de tripsina. Después del tratamiento térmico, las proteínas de soya se sometieron a hidrólisis controlada con la tripsina inmovilizada. Las proteínas de soya libre de los residuos inhibidores de tripsina mostraron un aumento considerable en la solubilidad a pH ácidos. El índice de digestibilidad de la pepsina a pH 4.0 y el índice de digestibilidad de la quimotripsina a pH 8.0 fueron mejorados. Estos resultados sugieren que la proteína de soya predigeridas, pueden utilizarse en las fórmulas infantiles (Ge and Zhang, 1993).

Otros investigadores, estudiaron la hidrólisis enzimática de la caseína obtenida de leche en polvo semidescremada mediante el uso de endopeptidasa y exopeptidasa inmovilizadas, colocadas en reactores de columna. Las proteasas (tripsina, tripsina/quimiotripsina, ficina, papaína, y de *A. oryzae*) fueron inmovilizadas en quitina de camarón y tratadas previamente para quitar los grupos aminos y modificar su forma. Las exopeptidasas (pancreáticas y renal porcina) fueron mezcladas con quitina de camarón y 1% de glutaraldehído. La eficiencia de la transferencia de masa de las proteínas se mejoró utilizando la cáscara de quitina de camarón como soporte enzimático, que formó una estructura de red dentro del reactor de columna que evitó la formación de precipitado proteico e incrementó la tasa de flujo de la solución proteica. La proteasa inmovilizada de *A. oryzae* fue la más efectiva en romper las moléculas de caseína y liberar los aminoácidos de los hidrolizados de caseína obteniéndose 34,81% de aminoácidos libres. Los hidrolizados de caseína se caracterizaron por su alto grado de hidrólisis y su alto contenido en aminoácidos libres. Para mejorar las propiedades sensoriales y funcionales de los hidrolizados de las proteínas de la leche se han usado exopeptidasas pancreáticas porcinas inmovilizadas, aumentando la blancura de la leche descremada (Gea *et al.*, 1996).

Las enzimas α -galactosidasa obtenida de garbanzo blanco (*Cicer arietinum*) se inmovilizó en grafeno funcionalizado usando un brazo espaciador (cisteamina) y un reticulante (glutaraldehído) con una eficacia de inmovilización del 84%. Los oligosacáridos de rafinosa (RFO) se extrajeron tratando la harina de soya con etanol en un rotavapor. La enzima α-galactosidasa inmovilizada mejoró su estabilidad térmica a 80°C y retuvo casi el 90% de su actividad durante 60 minutos. Además, cuando se mantuvo a 4ºC no presentó perdida

de actividad durante 10 días y retuvo el 74% de su actividad por 120 días. La enzima soluble mostró una mejor degradación de los oligosacáridos de rafinosa (81%) que la enzima inmovilizada (75%), posiblemente a limitaciones difusionales. Este nano-biocatalizador es fácilmente separado de la mezcla de reacción, centrifugando a baja velocidad y por métodos de sedimentación. Los oligosacáridos de la familia de la rafinosa son los principales responsables de la flatulencia al tomar leche de soya y la enzima inmovilizada se podría utilizar para la hidrolisis de estos oligosacáridos (Singh *et al.*, 2014; Agyei, Shanbhag and He, 2015).

2. Metodología

La identificación del microorganismo se realizó por la presencia de varios viales probablemente de la misma cepa, codificadas en forma diferente (34.1, IBUN 91.2.98, *Lactococcus lactis*) y falta de reportes en su identificación (Flórez, 2014). Se procedió a realizar la identificación del microorganismo IBUN 91.2.98, producción de la enzima, purificación e inmovilización de la enzima dextransacarasa. El trabajo se realizó en el laboratorio de enzimas del Instituto de Biotecnología (IBUN) de la Universidad Nacional de Colombia.

2.1 Materiales y métodos

2.1.1 Identificación del microorganismo nativo

En el presente trabajo se utilizó una cepa nativa colombiana aislada a partir de caña de azúcar de Moniquirá (Boyacá) por el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (Saenz and Prado, 1998), codificada como IBUN 91.2.98 y almacenada a -80ºC en glicerol al 20% (v/v).

La cepa IBUN 91.2.98 se sembró en agar sacarosa al 8% y se verificó su pureza a través de la coloración de Gram. Para la activación de la cepa, se tomó una colonia aislada del crecimiento en el medio se sacarosa al 8% y se inoculó el microorganismo en 10 ml de caldo sacarosa al 6%. Se incubó a 30 °C, 150 r.p.m por un tiempo aproximado de 12 horas. Se agregó los 10 ml del inoculo a 190 ml de caldo sacarosa al 6% e incubó a 30 °C, 150 r.p.m hasta una densidad óptica 600 nm (DO_{600}), aproximada de 0,83 (mitad fase exponencial).

En un tubo de Falcon nuevo, se centrifugó 10 ml del cultivo por 10 minutos a 5000 rpm y a 4 °C. Se desechó el sobrenadante y al sedimento se le adicionó 2 ml de buffer TE. Luego, se centrifugó 10 minutos a 5000 rpm y se almacenó a -20 °C.

La extracción DNA se realizó siguiendo el procedimiento del kit comercial (MO BIO), catalogo No 12224-250. El procedimiento fue el siguiente:

El sedimento fue resuspendido en 300 µl de solución Microbead, solución que contiene buffer y sales que estabiliza y dispersa homogéneamente la célula microbiana antes de ser lisada. Se mezcló suavemente en vortex.

Se transfirió el resuspendido celular en un tubo de Microbead y se adicionó 50 µl de solución MD1, que contiene SDS (dodecilsulfato sódico) y otros agentes que son requeridos para la lisis celular. El SDS es un detergente aniónico que rompe ácidos grasos y lípidos asociados con la membrana celular de varios organismos.

En un Vortex se colocó el tubo Microbead en forma horizontal a máxima velocidad por 20 minutos para crear condiciones combinadas de lisis química y mecánica, liberando el ácido nucleico de la célula bacteriana. Se centrifugó a 14.000 r.p.m por 30 segundos a temperatura ambiente. Se pasó el sobrenadante a un tubo de colección suministrado (2 ml) y se adicionó 100 µl de solución MD2 que contiene un reactivo para precipitar material orgánico e inorgánico no DNA, incluyen detritos celulares y proteínas. Se mezcló en vortex por 5 segundos e incubó a 4°C por 5 minutos. Posteriormente, se centrifugó a 14.000 r.p.m por 1 minuto a temperatura ambiente. El sedimento contenía material orgánico e inorgánico no DNA, incluyendo células y detritos. Luego, se colocó el sobrenadante aproximadamente 450 µl en un tubo (2ml) y se agregó 900 µl de solución MD3, conteniendo alta concentración de sales necesaria para unir el DNA a la membrana del filtro Spin, en la etapa siguiente. Se mezcló en vortex por 5 segundos.

En un tubo conteniendo un filtro Spin, se pasó 700 µl de la mezcla anterior y se centrifugó a 14.000 r.p.m por 30 segundos a temperatura ambiente. Se descartó el filtrado y se pasó el resto de la mezcla al filtro Spin. Se centrifugó a 14.000 r.p.m por 30 segundos. El DNA se pegó a la membrana de sílica. Se agregó 300 µl de MD4, conteniendo etanol que removió residuos de sales y otros contaminantes. Se centrifugó a 14.000r.p.m a temperatura ambiente por 30 segundos y se descartó el filtrado. Se centrifugó a temperatura ambiente por 1 minuto a 14.000 r.p.m para remover trazas de la solución de MD4 que puede interferir con la secuencia del DNA. Se pasó el filtro Spin a un tubo suministrado y se agregó 50 µl de agua destilada estéril MilliQ en el centro del filtro, para asegurar que la membrana quede totalmente humedecida. Se centrifugó a 14000 r.p.m por 1minuto a temperatura ambiente. El DNA se liberó de la membrana al tubo de colección, se almacenó a 4°C. El DNA solo está unido a la membrana en presencia de sales.

La electroforesis del DNA genómico se realizó en un gel al 0,8 % en buffer TAE 1X y teñidos con bromuro de etidio (0,5 µg/ml). Se utilizó el marcador de peso molecular 250 pb DNA Ladder (Invitrogen). La corrida se realizó a 100 voltios por 30 minutos. El gel fue visualizado en el fotodocumentador (Bio-Rad- ChemiDoc XRS).
La valoración de la concentración de ADN se realizó en un espectrofotómetro (UV-Visible, Evolution 201) a 260 nm-280 nm utilizando como blanco agua MilliQ. La concentración de ADN fue de 31 ng/µl. La calidad del ADN se determinó por la relación 260/280 y 260/230, realizando una dilución 1:10 en agua destilada MilliQ.

- Relación 260/280: Es útil para evaluar la pureza del ADN. El valor esperado está en el intervalo de 1,8-2,0. Si la relación es apreciablemente más baja, puede indicar la presencia de proteínas que absorben fuertemente a 280nm. La muestra en la relación 260/280 fue de 1,8.
- Relación 260/230: Se utiliza como una medida secundaria de la pureza del ADN. El valor esperado está en el intervalo de 2,0-2,2. Si la relación es inferior, puede indicar la presencia de contaminantes que absorben a 230nm. La muestra en la relación 260/230 fue de 2,28.

Se realizó la identificación del microorganismo, amplificando el gen RNAr 16S (1500pb), empleando primers universales 27F y 1492R. La mezcla de reacción fue de 25 µl, constituida por 2,5 µl de Buffer 10 X, 0,75 µl de $MgCl_2$ 50 mM, 0,5 µl de dNTPs 10 mM, 0,5 µl de Taq ADN polimerasa 5 U/ µl (Invitrogen), 2 µl de cada primer a 5 µM y 100 ng de ADN extraído. La PCR se realizó en un termociclador (Biorad) por treinta ciclos bajo las siguientes condiciones: Desnaturalización a 94°C por 45 segundos, anillamiento con gradiente de 54 °C a 55°C por un minuto y elongación a 72 °C por tres minutos y una extensión final a 72 °C por 15 minutos. El producto de la amplificación fue verificado por electroforesis en gel de agarosa al 0,8% en buffer TAE1X y teñidos con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) y fueron visualizado en el fotodocumentador (Bio-Rad- ChemiDoc XRS).

El producto del PCR fue secuenciado bajo las siguientes condiciones:
Se preparó 10 µl de producto del PCR purificado más 1,2 µl de cada primer 10 µM (Forward o Reverse) con una concentración del producto del PCR de 12 ng/ µl cuantificado por NanoDrop. La secuenciación fue realizada por el Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia, utilizando el equipo ABI 3500 Genetic Analyzers Hitachi.

Las secuencias obtenidas se le evaluó su calidad y fueron editadas analizando el cromatograma, empleando el programa Chromas y el electroferograma con el programa Electropherogram quality analysis.

Las secuencias forward y reverse fueron alineadas empleando el programa BioEdit Sequence Alignment. Las secuencias obtenidas fueron comparadas en la base de datos GenBank, usando la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

2.1.2 Crioconservación

Para garantizar la idoneidad y homogeneidad de la cepa se siguió el protocolo de crioconservación establecido por el grupo de investigación de microbiología del IBUN, dejando la concentración final del crioconservado al 10% en glicerol para ser utilizado en las fermentaciones.

La cepa se sembró en agar sacarosa al 6% e incubó a 30ºC por 24 horas. Una colonia aislada se sembró en un schott de 50 ml, conteniendo 5% del volumen total del medio (200 ml), del caldo sacarosa al 6% estéril (10 ml) y se dejó aproximadamente por 12 horas en agitación a 150 r.p.m. A las 12 horas se agregaron los 10 ml a un schott de 250 ml que contenía los 190 ml de medio de caldo sacarosa al 6%, mantenido en las mismas condiciones. Se monitoreo el crecimiento bacteriano haciendo el seguimiento de la cinética de crecimiento por densidad óptica a 600 nm (DO_{600}), hasta llegar a 2,28 (mitad de la fase exponencial) y usando como blanco el medio de cultivo. Previamente se prepararon 100 ml de caldo sacarosa al 6% con glicerol al 20% y se esterilizó 20 minutos,15 libras de presión. A los 100 ml de medio con glicerol al 20%, se adicionaron 100 ml del medio con crecimiento bacteriano, obteniendo una concentración del 10%. Se dejó 20 minutos en agitación suave a 100 r.p.m a 30 ºC. Se agregó 1 ml en viales y se congeló a - 20 grados centígrados. El crioconservado se dejó al 10% de glicerol y se almacenó a -20 ºC para evitar una recristalización de las muestras almacenadas a muy bajas temperaturas (- 80 °C), con pérdida de actividad de acidificación por las altas concentraciones de glicerol que durante el enfriamiento puede ocasionar un desequilibrio osmótico (Fonseca, 2006).

2.1.3 Medio de fermentación

El medio de cultivo utilizado para la producción de la enzima es un medio modificado del utilizado por Tsuchiya *et al* (Tsuchiya and Koepsell, 1952).

La composición del medio de cultivo para el *L. mesenteroides* se encuentra en la Tabla 2-1.

Tabla 2-1: Medio de cultivo de fermentación.

Azúcar blanca especial, grado comercial[1].
Reactivos grado Analítico[2].
H_3PO_4 al 85% y densidad 1,695 g/ml[3].
El pH del medio se ajustó a 7,2±0,01, con una solución concentrada de hidróxido de potasio (KOH) antes de esterilizar a 121ºC, 15 psi, por 15 minutos.

Componentes	**Concentración(g/L)**	**Casa comercial**
Sacarosa[1]	60	Riopaila
Extracto de Levadura	10	Oxoid
$CaCl_2$ 2 H_2O[2]	0,14	Panreac.
$MgSO_4$. $7H_2O$[2]	0,04	J.T.Baker.
$FeSO_4$. $7H_20$[2]	0,04	Panreac.
$MnSO_4.H_2O$[2]	0,02	J.T.Baker.
NaCl	0,01	Panreac.
Ácido fosfórico (H_3PO_4)[3]	6,7 ml	Panreac.
Agua destilada *c.s.p*	1000 ml	-

2.2 Producción de dextransacarasa.

2.2.1 Activación de la cepa

La cepa crioconservada en glicerol al 10% almacenada a - 20 ºC, se inoculó en el medio de fermentación (Tabla 2-1), empleando como volumen de siembra el 5% del medio a fermentar. El inóculo se activó en frascos schott de 50 ml conteniendo 15 ml de medio de cultivo estéril, inoculando 15 µl del microorganismo crioconservado con una densidad óptica de 2,28 a 600 nm ($D.O_{600}$). Se incubó a 30 ºC, 150 r.p.m en un agitador orbital (Thermo Scientific Max Q 4000) durante 12 horas hasta una densidad óptica aproximada de 5,5 a 600 nm ($D.O_{600nm}$).

2.2.2 Fermentación para obtención del extracto

Se realizó una fermentación en lote en Schott de 500 ml con un volumen de medio total de 300 ml. Se agregó los 15 ml del inóculo activado con una densidad óptica aproximada de 5,5 a 600 nm (D.O $_{600nm}$) a 275 ml del medio restante. Se incubó a 30 ºC en una incubadora con agitación orbital (Thermo Scientific Max Q 4000), a una velocidad de 150 r.p.m. La determinación cinética de crecimiento indirecto del microorganismo se realizó por turbidez a 600 nm (D.O $_{600nm}$), en un espectrofotómetro Mapada modelo UV-1800. Las mediciones se realizaron desde la inoculación, denominada hora cero, hasta las 6 horas para la curva de crecimiento bacteriano y 4 horas para la obtención del extracto enzimático (crudo). Cada hora, se monitoreó el pH con un equipo Ohaus Starter 3100. A partir de D.O mayores de 0,8 se hacen diluciones 1:10, diluyendo la muestra en medio de cultivo estéril.

A medida que aumenta el crecimiento bacteriano aumenta la densidad óptica, disminuye el pH y aumenta la viscosidad del medio. Se detuvo la fermentación a las 4 horas y se ajustó el pH a 5,2-5,4. Se separaron las células del sobrenadante, centrifugando a 10.000 r.p.m durante 10 minutos a 4 ºC (dos veces) en una centrifuga Hermle Z323K. Al final de la centrifugación, se separó el sobrenadante y descartó el sedimento. Luego se agregó 0,5 ml del sobrenadante o extracto enzimático en varios eppendorf (1,5 ml) para determinación de proteína totales y se almacenó a - 20 grados centígrados. Para la determinación de la actividad, se agregó 2 ml del extracto enzimático en viales y se almacenó a 4 ºC.

2.2.3 Determinación de la actividad enzimática.

Se determinaron dos actividades enzimáticas: actividad hidrolítica, definida como la cantidad de enzima que se necesita para liberar un µmol de glucosa en un minuto a 30 ºC y a pH de 5,2-5,4, en una solución con sacarosa al 16% (p/v) en buffer fosfato 50 mM.
La actividad de transferencia se definió, como la cantidad de enzima necesaria para transferir un µmol de glucosa en un minuto a la cadena de polisacárido a 30 ºC y a pH de 5,2-5,4, en una solución con sacarosa al 16% (p/v) en buffer fosfato 50 mM.

El ensayo de las actividades enzimáticas de la enzima dextransacarasa se realizó en un reactor de vidrio enchaquetado, empleando 4 ml de una mezcla de reacción en la relación 1:1 (2 ml de sustrato sacarosa al 16%, en buffer fosfato 50 mM, pH 5,2-5,4: 2 ml del extracto

enzimático obtenido en el numeral 2.2.2), a una temperatura de 30 ºC. Se tomaron muestras de 300 µl a las 0, 5, 10, 15, 20, 30, 40 y 50 minutos. Ver anexo A.

2.2.4 Cálculos de la actividad enzimática

El cálculo de la actividad hidrolítica se determinó por diferencia de los azúcares reductores totales (glucosa y fructosa libres), determinados por el método del ácido dinitro-salicílico (DNS) menos la glucosa libre realizada con el método enzimático de GOD-POD de Spinreact, dando como resultado la fructosa libre, que equivale a la glucosa libre.

Para la actividad de transferencia, la fructosa libre es igual a fructosa total, pues no se transfiere fructosa. La cantidad de glucosa total (glucosa libre más glucosa transferida) es equivalente a la fructosa total por la hidrolisis de la sacarosa. Se determina la pendiente de la curva de la diferencia de DNS (glucosa y fructosa libres) menos 2 kit (glucosa libre) que es igual a la glucosa transferida versus el tiempo de reacción (Flórez, 2014).

Los cálculos se explican en el anexo A. Los fundamentos de las técnicas se encuentran en los anexos B y C.

2.3 Determinación de proteínas totales: Método fluorométrico (Qubit).

La concentración de proteínas totales fue medida fluorométricamente utilizando el equipo Qubit® 2.0 de Invitrogen ®. Se atemperaron los reactivos (reactivo Qubit, buffer Qubit, estándares) a temperatura ambiente. En un eppendorf de 1,5 ml, se agregaron 199 µl de Buffer Qubit y un microlitro del reactivo Qubit (solución de trabajo) por cada muestra a analizar. En un tubo de pared delgada de 0,5 ml para Qubit, se agregaron 180 µl de la mezcla (buffer y reactivo Qubit) y 20 µl de la muestra. La curva se hizo según las indicaciones del kit empleando tres estándares: 0 ng/ µl, 200 ng/ µl y 400 ng/µl de albúmina sérica bovina y es realizada internamente por el equipo. Se mezcló en vortex por 2-3 segundos y se incubó 15 minutos a temperatura ambiente. Se realizó la lectura en el fluorómetro Qubit. Anexo D.

La actividad específica es una medida de la pureza de una solución enzimática y se reportó como las unidades de dextransacarasa por miligramo de proteína (U/mg). Este valor se

obtuvo dividiendo el número de unidades/ml de la muestra enzimática (actividad) por la concentración de la proteína de la muestra analizada (Baines, 2001).

2.4 Purificación parcial y concentración del extracto

El extracto enzimático obtenido a las 4 horas de fermentación (numeral 2.2.2) y con un pH ajustado a 5,2-5,4, fue centrifugó 10.000 r.p.m, 4 °C. Se desechó el sedimento y el sobrenadante se volvió a centrifugar a 4 °C, 10000 r.p.m. El sobrenadante fue dejado a 4 °C para ser ultrafiltrado. La ultrafiltración se realizó agregando 12 ml del sobrenadante en los tubos Amicon Ultra-50K con un punto de corte de 50.000 MWCO. Se centrifugó 15 minutos a 5000 g a 4 °C en una centrifuga Hermle Z323K, para remover material por debajo del peso molecular de 50 kDa. Este proceso se repitió dos veces y se obtuvo la muestra introduciendo una pipeta Pasteur estéril. La muestra concentrada fue recuperada a un volumen de 9 ml y almacenadas a 4ºC, anexo E. Luego se les realizó la actividad enzimática.

Se recomienda utilizar una membrana con un MWCO al menos dos veces más pequeño que el peso molecular de la proteína que se pretende concentrar. El MWCO, indica aproximadamente la capacidad de retención y no existiendo un procedimiento normalizado para la determinación de la MWCO, por lo que la información facilitada por los proveedores no siempre es fiable.

Las membranas de ultrafiltración se clasifican en función del peso molecular nominal de corte, siendo la forma de la molécula a retener importante. Las moléculas lineales pasan a través de las membranas, mientras que las moléculas globulares con la misma masa molecular de la lineal son retenidas. Además, otros factores afectan la permeación a través de las membranas de ultrafiltración como el pH, que cambia la conformación de la molécula en su forma ionizada, haciéndola más flexible o menos flexible para pasar por los poros de la membrana (Baker, W, 2004).

En nuestro caso la enzima tiene un peso molecular aproximado entre 170-180 kDa y el punto de corte de la membrana de los tubos Amicon Ultra-15 es de 50.000 MWCO (50 kDa).

2.5 Electroforesis SDS-PAGE.

La electroforesis en geles de poliacrilamida y dodecil sulfato de sodio se realizó en condiciones desnaturalizadas (SDS-PAGE) de acuerdo al método de Laemmli (Laemmli, 1970). Se utilizó una unidad vertical para mini geles marca BIORAD a un voltaje inicial de 90 V por 20 minutos y luego 100 V hasta el final de la corrida. El gel de concentración (resolving) fue del 4% y el de separación de 7,5% de acrilamida, ver fundamento de la técnica, procedimiento en el anexo F.

Las muestras de extracto enzimático no ultrafiltrado y ultrafiltrado fueron preparadas en una solución de carga conteniendo, buffer 60 mM Tris-HCL (pH 6,8), dodecil sulfato de sodio 2% (SDS) (p/v), glicerol 10% (p/v), 2- mercaptoetanol 14,4 mM y azul de bromofenol al 0,1%. Las muestras con la solución de carga se calentaron por 10 minutos a 100 ºC.

Las bandas de proteínas fueron teñidas durante 50 minutos con azul de Coomassie al 0,1% (p/v) R-250 en agitación orbital suave y decoloradas dos veces con una solución preparada en agua HPLC, conteniendo 14.3% de metanol y 14.3 % de ácido acético glacial. Además de la muestra, se corrió como control albúmina sérica bovina de Sigma, con un peso molecular aproximado de 66 kDa y la enzima dextranasa comercial Plus L de Novozymes (EC 3.2.1.11), del hongo *Chaetomium erraticum* para conocer el peso molecular aproximado. La dextranasa fue suministrada por el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia. Para estimar el peso molecular de las bandas, se empleó el marcador Opti-Protein XL. Se utilizó el fotodocumentador (Bio-Rad- ChemiDoc XRS) para visualizadas las bandas.

2.6 Soportes para inmovilizar.

- Eupergit® CM Sigma- Aldrich. Copolímero de metacrilamida, N, N′-metilen-bis (acrilamida) y un monómero que lleva grupos oxirano, unido a polímero de epóxido. Tamaño de poro de 50-300 µm y contenido de grupo oxirano ≥ 0,25 %.
- Sephadex G-100. Gel con diámetro de perla de 40-120 µm y un rango de fraccionamiento de proteínas globulares de 4- 150 kDa, suministrado por el

laboratorio de tecnología de enzimas del IBUN, hidratado previamente. Hinchado del gel: 1 g se hincha a 15-20 mL gel.

2.6.1 Inmovilización de la enzima en Eupergit CM

El soporte utilizado Eupergit fue de alta pureza. A 30 ml de extracto enzimático purificado parcialmente y concentrado del numeral 2.4, se le agregó 0,1 y 0,5 gramos de Eupergit CM. Se dejó en agitación suave durante 72 horas a 4°C. Luego se filtró al vacío empleando membranas Sartorius Stedim de nitrato de celulosa con un tamaño de poro de 0,2 µm. El biocatalizador se lavó dos veces con buffer fosfato 50 mM (pH 5,2-5.4) y se dejó en los 30 ml de buffer fosfato (pH 5,2-5.4) a 4°C. Se realizó la actividad enzimática en 4 ml de una mezcla de reacción 1:1 (2 ml de sustrato sacarosa al 16%, en buffer fosfato 50 mM, pH 5,2-5,4 y 2 ml del biocatalizador en buffer fosfato 50 mM, pH 5,2-5.4, anexo G. Se observó el biocatalizador en microscopia electrónica de barrido.

El protocolo de inmovilización mencionado se siguió modificando la metodología reportada por Aránzazu *et al* (Gómez de Segura *et al.*, 2004).

2.6.2 Inmovilización de la enzima en Sephadex G-100

El reactivo Sephadex G-100 fue suministrado por el laboratorio de enzimas del Instituto de Biotecnología. El Sephadex se encontraba hidratado y conservado en etanol al 20% a 4°C. Se lavó tres veces en buffer fosfato 50 mM (pH 5,2-5.4) y se esterilizó a 121ºC, 15 psi, por 15 minutos. Se filtró al vacío utilizando membranas de celulosa con un tamaño de poro de 0,45 µm. Se pesaron 1 y 3 gramos de Sephadex G-100 en una balanza analítica Radwag y fueron agregados a 30 ml del extracto enzimático parcialmente purificado y concentrado según numeral 2.4. Se dejó en agitación muy suave durante 12 horas a 4°C y se filtró al vacío. El biocatalizador se dejó en los 30 ml de buffer fosfato 50 mM (pH 5,2-5.4) a 4°C. Se realizó la actividad enzimática empleando 2 ml del biocatalizador en buffer fosfato 50 mM (pH 5,2-5.4) y 2 ml de sustrato sacarosa al 16%, en buffer fosfato 50 mM, pH 5,2-5,4, anexo G. Se realizó la observación del biocatalizador por microscopia electrónica de barrido.

La metodología realizada fue modificada de la reportada por Nam So et al (Han, Kang and Robyt, 2005).

2.7 Microscopia electrónica de barrido

La microscopia electrónica de barrido (SEM) se realizó para analizar la superficie de las muestras. Las muestras fueron recubiertas con 5 nm de oro en un equipo Q150R marca Quorum. El microscopio electrónico empleado fue un Tescan Vega SB con un detector de rayos X Bruker con acelerador de voltaje de 15.0 kV, a una distancia de trabajo de 9 a 10 mm. Se realizó el análisis de las imágenes empleando el programa Image J.

3. Resultados y discusión

3.1 Cepa *Leuconostoc mesenteroides.*

La cepa IBUN 91.2.98 se sembró en medio de agar sacarosa al 8% (numeral 2.1.1), 30°C por 24 horas. Se esperaba el crecimiento de colonias de apariencia viscosa por la producción de dextrano producto de la hidrolisis del enlace glucosídico de la sacarosa, utilizando la sacarosa como fuente de carbono durante su crecimiento (Leroy and De Vuyst, 2016).

Se analizó por medio de la coloración de Gram la pureza del cultivo y la morfología y disposición de las células, observándose cocos Gram positivos en pares o cadenas, es decir, son Gram positivas porque retuvieron la coloración azul violácea, (Holland and Liu, 2011; Liu-S-Q., 2016). Ver la Figura 3-1.

Figura 3- 1: Cultivo y observación microscópica de la cepa IBUN 91.2.98.

a. Producción de dextrano por la enzima dextransacarasa de la cepa IBUN 91.2.98 cultivada en placa en presencia de sacarosa.
b. Cocos Gram positivos, observación microscópica (100X).

Los microorganismos Gram positivos tienen una pared gruesa de aproximadamente un 80% peptidoglucano, la cual da resistencia y protección al microorganismo. En la

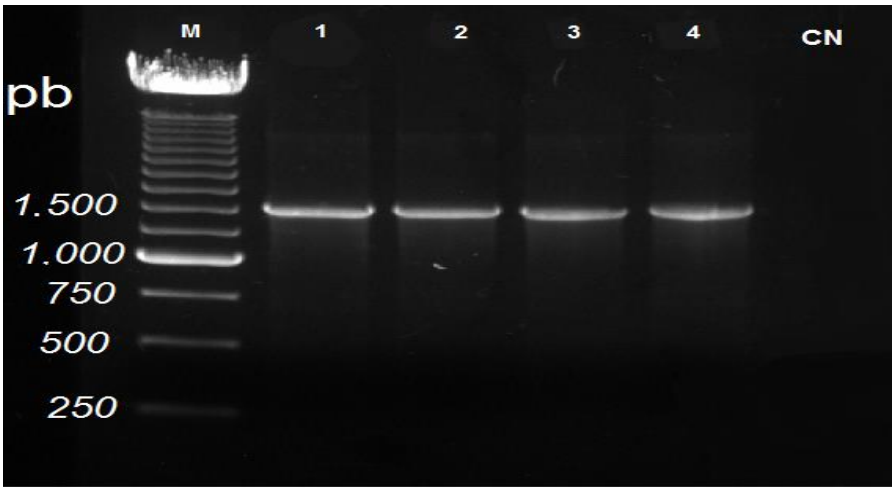
coloración de Gram, se aplicó el colorante primario (cristal- violeta), el cual penetró y tiñó las bacterias de azul. Luego se agregó la solución de yodo que ingresó a las células y formó un complejo insoluble en agua con el colorante cristal violeta. Posteriormente, las células fueron tratadas con alcohol - acetona, que deshidrató la pared y cerró los poros permitiendo que el colorante cristal- violeta no salga (Popescu and Doyle, 1996).

Con el fin de confirmar la identidad de la cepa IBUN 91.2.98 en el trabajo, se decidió hacer su identificación amplificando el gen 16 S RNAr.

3.1.1 Identificación bacteriana por PCR.

Por medio de la técnica de PCR se amplificó la región 16 S ARNr utilizando los primers 27F (Forward) y 1492R (Reverse), empleados para estudios filogenéticos bacterianos. Los resultados de la electroforesis indicaron que la longitud de cada amplicón era de aproximadamente 1500 pb (pares de bases), ver Figura 3-2.

Figura 3-2: Análisis electroforético de la amplificación del gen 16S RNA r.



Línea M: Marcador de peso molecular 250 pb DNA Ladder (Invitrogen).
Líneas 1-4: Fragmento amplificado de 1500 pb del gen 16S RNAr.
CN: Control negativo.

Similares resultados fueron reportados mediante amplificación parcial del 16S ARNr (1500 nucleótidos) por PCR empleando los mismos primers para la identificación de cepas presumiblemente bacterias ácido lácticas, 159 cepas aisladas de leches fermentadas de

yak, yegua y vaca (Ren, Liu and Zhang, 2015) y 219 cepas aisladas de masas madres fermentadas de pan de trigo recolectadas en la ciudad de Ya'an (China), (Liu *et al.*, 2018)

3.1.2 Secuenciación del producto

El producto de PCR fue secuenciados por el Instituto de Genética y los resultados obtenidos fueron comparados con las secuencias de 16S ARNr de la base de datos GenBank empleando el software BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

Las secuencias resultaron en una similitud del 99,51% con la cepa *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *Jonggajibkimchii* con ID de secuencia NR 157602.1, una similitud del 99, 50 % con la cepa *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8293 (NR 074957.1), *Leuconostoc mesenteroides* subsp. dextranicum cepa NBRC 100495 (NR 113911.1), *Leuconostoc mesenteroides* JCM 6124 (NR 113251.1) y *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* NCFB 529 (NR 040817.1).

La comparación entre la secuencia obtenida de la cepa IBUN 91.2.98 y las depositadas en la base de datos (BLAST) arrojó un porcentaje de identidad del 99,5%. Por lo anterior, la secuencia corresponde a *Leuconostoc mesenteroides*, ver anexo H.

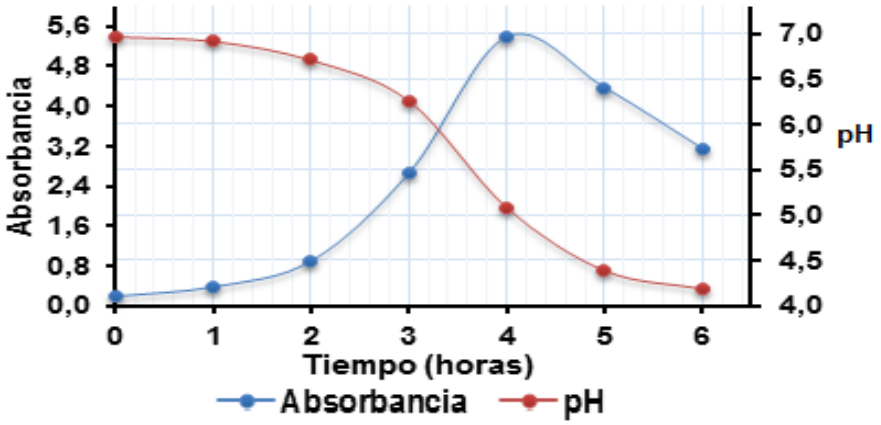
3.2 Fermentación por lote.

3.2.1 Cinética de fermentación de *L. mesenteroides* IBUN 91.2.98 asociada al producto dextrano.

En la Figura 3-3 se observa una curva de crecimiento de la cepa *Leuconostoc mesenteroides* IBUN 91.2.98 realizada por el método indirecto de la medición de la turbidez por medio de la densidad óptica.

Se llevó a cabo durante un proceso de fermentación en lote sin control del pH, con el fin de conocer las características cinéticas del crecimiento del microorganismo con una concentración de inoculo (1µl crioconservado/ml medio), pH del medio inicial 7,2±0,01 y una concentración en el medio de fosfatos de 0,1M.

Figura 3- 3: Comportamiento de la densidad óptica y pH en el crecimiento de *Leuconostoc mesenteroides* cepa IBUN 91.2.98.



Crecimiento en caldo sacarosa al 6%, 150 r.p.m, 30 °C durante 6 horas.

El crecimiento indirecto del microorganismo acompañado con la producción de dextrano, se determinó con el aumento progresivo de la DO_{600} y seguido por el cambio de pH, desde el pH inicial del medio de 7,2±0,01 a 6.9 en la primera hora, hasta 6,3 a las tres horas de fermentación, en donde el pH fue compatible según algunos autores con el crecimiento, producción y la estabilidad de la enzima (Goyal, Nigam and Katiyar, 1995).

Las fermentaciones se realizaron hasta las cuatro horas con un pH aproximado de 5,1, el cual está dentro del rango de pH de 5,0 - 5,5 de alta actividad y estabilidad de la dextransacarasa informada por algunos investigadores (Lazić *et al.*, 1993; Naessens *et al.*, 2005). Además, se obtuvo un aparente crecimiento máximo bacteriano, correlacionado con el valor más alto de la densidad óptica (DO_{600} de aproximadamente 5,4), siendo las mediciones de densidad óptica no conveniente con respecto a las mediciones de la biomasa, debido a la presencia del dextrano y otros componentes precipitados del medio, datos no reportados.

Algunos investigadores reportaron que la producción de dextransacarasa ocurría durante el crecimiento bacteriano, no estaba directamente conectado a la formación de biomasa, ya que las condiciones de aireación que mejoran el rendimiento de biomasa no mejoraron el rendimiento de la producción de la enzima (Dols, Remaud and Monsan, 1997).

A las cuatro horas de la fermentación sin control del pH, se obtuvo una actividad enzimática de 5,4 U /ml con un pH cerca al pH óptimo de 5 de la dextransacarasa, reportado en otras investigaciones (Flórez, Buitrago and Ospina, 2018). Luego la actividad disminuyó, debido a la disminución del pH por acción principalmente del ácido láctico producto de la fermentación, llegando a un pH por debajo del óptimo, afectando la actividad de la enzima, siendo reportado por algunos investigadores (Michelena *et al.*, 2003).

A partir de las cinco horas de fermentación se observó la caída de la densidad óptica a 4,4 y del pH a 4,4, llegando a las 6 horas a una densidad óptica de 3,1 y un pH de 4,2, indicando que el crecimiento del microorganismo y la enzima probablemente puede haberse afectado por el pH.

El crecimiento bacteriano se acompaña de una producción de ácido láctico con acidificación que ocasiona la detención del crecimiento celular y, posiblemente, la muerte o lisis celular debido a la entrada en el citoplasma de la forma no disociada de ácido láctico que disminuye el pH intracelular, provocando la desnaturalización de las enzimas esenciales e interfiere con el transporte de nutrientes, con daño de la membrana celular y lisis celular, observándose al final una disminución de la absorbancia (Ju, Kim and Lee, 2016). Otros investigadores reportaron que el crecimiento del microorganismo disminuye debido posiblemente al consumo de las fuentes de nitrógeno y es confirmado indirectamente por la disminución del rendimiento enzimática y la disminución del incremento en la medición de la densidad óptica del medio. Además encontraron que el pH de 5.5 a 4°C, la enzima dextransacarasa era más activa y estable (Lazić *et al.*, 1993) y a pH de 5,2-5,6 (Argüello *et al.*, 2005).

Investigadores estudiaron el tiempo de fermentación que tiene un efecto significativo en el cultivo de células microbianas de *Weisella confusa* y en la producción de metabolitos (enzima dextransacarasa) y determinaron el tiempo óptimo requerido para el crecimiento bacteriano máximo y el rendimiento enzimático. Los resultados indicaron que el máximo rendimiento enzimático depende del crecimiento de las células bacterianas, siendo algunas células bacterianas sensibles al pH, afectando la actividad metabólica del microrganismo (Zafar *et al.*, 2018).

Durante el transcurso de la fermentación se observó el medio más claro debido a la presencia de dextrano en suspensión y viscoso por la formación de dextrano, dificultando la separación del extracto enzimático de las células bacterianas y por ende la obtención de la enzima. Esta experiencia del incremento en la viscosidad del medio ocasionado por la producción del dextrano que interfiere con la producción y purificación de la enzima ha sido reportado por Goyal y Katiyar (Goyal and Katiyar, 1997; Sarwat *et al.*, 2008).

La concentración de sacarosa en el medio al 6% fue utilizada (fuente de carbono), debido a que previos estudios diseñaron un medio modificado de *Tsuchiya* al 6% y estudiaron la enzima dextransacarasa obteniendo una actividad enzimática 6,9 U/ml (Flórez, 2014).

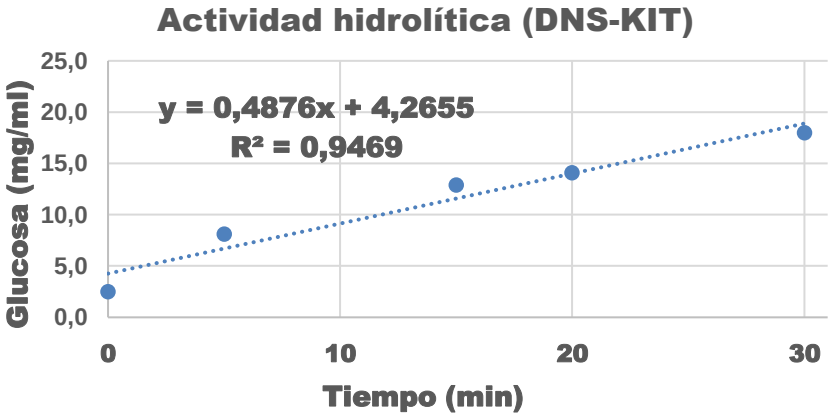
Según *Tsuchiya et al*, concluyeron que la concentración de la sacarosa en el medio para la producción de la enzima era óptima al 2% (p/v), ya que concentraciones mayores de sacarosa producían mayor cantidad de dextrano y dificultando la separación de las células bacterianas del extracto enzimático ocasionado por la viscosidad (Tsuchiya *et al.*, 1952).

Otros investigadores estudiaron la producción de la enzima dextransacarasa cultivando la cepa *Leuconosctoc mesenteroides* B-512 F y B-1299 con una concentración de sacarosa en el medio del 4% y regulando el pH a 6,7, el cual es compatible con el crecimiento y la estabilidad de la enzima, lograron mejorar el rendimiento de la enzima y disminuyeron la producción del dextrano. Además, bajo condiciones estandarizadas observaron que la dextransacarasa de la cepa B-512 F era más sensible a pH que la cepa B-1299, resultando en una mejor actividad enzimática la enzima dextransacarasa de la cepa B-1299. (Dols, Remaud and Monsan, 1997).

Con el objetivo de establecer el tiempo de fermentación en el que se obtiene una buena actividad enzimática de la DS y utilizar esta condición para ser empleada en los cultivos posteriores se determinó la actividad enzimática hidrolítica a las 4, 5 y 6 horas de fermentación.

En la Figura 3-4 se muestra la gráfica correspondiente a la actividad hidrolítica a las 4 horas de fermentación.

Figura 3- 4: Actividad de la dextransacarasa a las 4 horas de fermentación.



La actividad catalítica de la enzima se determinó midiendo la velocidad inicial de reacción, que es la pendiente de la curva (sustrato transformado frente al tiempo) en el tiempo cero, figura 3-4, anexo A. El inicio de la reacción ocurre linealmente tomándose la pendiente de la recta como velocidad inicial, es decir, la velocidad de la reacción durante los primeros minutos cuando la formación de producto es lineal con respecto al tiempo. La caída de la velocidad de reacción puede ser debida a factores como disminución de la concentración de sustrato, cambios de pH, inactivación del enzima. El dato de actividad enzimática confiable en la determinación de la actividad enzimática la suministra el valor de velocidad inicial (durante el tramo inicial) de progreso lineal de la reacción. Teniendo en cuenta el valor de la pendiente en la figura 3-4 se calculó la actividad hidrolítica a las 4 horas de fermentación (Dols *et al.*, 1997) obteniendo una actividad de 5,4 U/ml. A las 5 horas de fermentación 3,47 U/ml (con R^2 de 0,8694) y a las 6 horas de fermentación 0,15 U/ml (con R^2 de 0,7518), ver anexo A.

En el estudio anterior de la enzima dextransacarasa de *L. mesenteroides* IBUN 91.2.98, la actividad enzimática a las 3 horas de fermentación fue más baja que a las 4 horas. A las cuatro horas reportaron una actividad máxima de 6,9 U/ml que coincidió con el final de la fase exponencial del crecimiento y una biomasa máxima de 2,29 g/L(Flórez, Buitrago and Ospina, 2018). Otros investigadores informaron que la producción de la enzima es proporcional al crecimiento bacteriano, obteniéndose valores más altos al final de la fase exponencial del crecimiento (Dols *et al.*, 1997; Michelena *et al.*, 2003).

El mejor resultado de actividad se obtuvo a las 4 horas de fermentación, por lo tanto, se estableció este tiempo para recuperar la enzima. La actividad de transferencia a las 5 y 6 horas de fermentación no se pudo determinar (datos no reportados), posiblemente debido al descenso del pH que modifica la estructura de la enzima y su capacidad catalítica, siendo la enzima dextransacarasa extremadamente sensible a condiciones desfavorables de pH (Tsuchiya *et al.*, 1952). Esta experiencia fue reportada por Mellano. M E, en el 2009, quien encontró que todas sus muestras almacenadas a 4°C presentaron un 30% de perdida de actividad a los 5 días de refrigeración, mostrando actividad hidrolítica y perdiendo la actividad de transferencia (Mellano, 2009).

Algunos reportes dicen que la degradación proteolítica de la enzima en el medio se incrementa con el tiempo de almacenamiento y cambios en el pH, ocasionando perdida de actividad y de su especificidad. Investigadores informaron que la actividad residual de las proteasas en muestras almacenas a 4°C es suficiente para modificar la enzima (Sanchez *et al.*, 1999).

La separación del extracto enzimático se dificultó debido a la viscosidad que produce el dextrano y el microrganismo que queda en el extracto después de la centrifugación sigue utilizando la sacarosa residual, disminuyendo el pH del extracto enzimático almacenado y afectando la enzima.

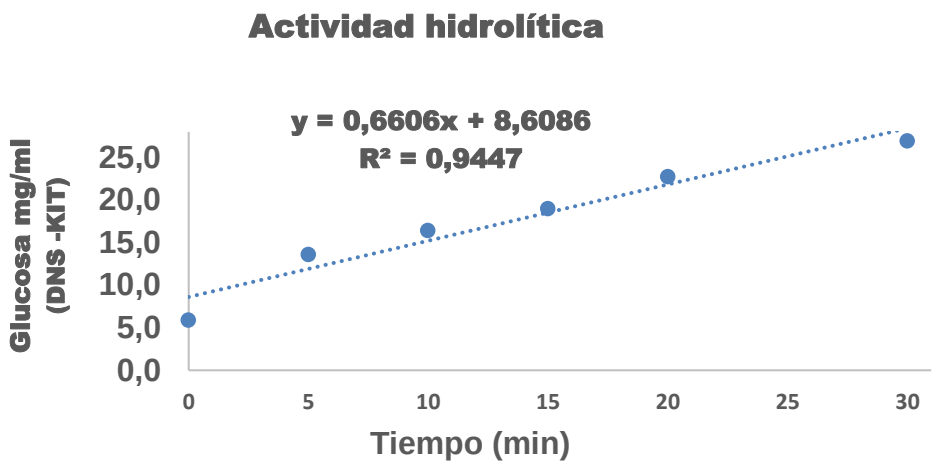
En este trabajo el medio de fermentación fue preparado con una concentración de fosfatos 0,1M para mantener el pH por arriba de 5 y evitar la desnaturalización de la enzima, siendo el punto isoeléctrico de la enzima de 4,2 (Flórez, 2014).

Las variaciones del pH del medio dan lugar a cambios en la forma iónica del sitio activo y cambios en la actividad de la enzima y por lo tanto la velocidad de reacción. Los cambios en el pH también pueden alterar la forma tridimensional de la enzima. Por estas razones, las enzimas solo están activas en un cierto rango de pH. El pH del medio puede afectar la velocidad de reacción máxima, el coeficiente de saturación, Km y la estabilidad de la enzima. En algunos casos, el sustrato puede contener grupos iónicos, y el pH del medio afecta la afinidad del sustrato a la enzima (Rodrigues, Lona and Franco, 2003; Liu, 2017).

Las enzimas tienen una máxima actividad a un determinado pH, la cual disminuye a medida que la solución sea más ácida o básica que su pH óptimo. El cambio de pH altera la ionización de los grupos carboxilo, amino y otros del sustrato o de la enzima, alterando la carga de la proteína, su solubilidad y su forma. A pH bajo (alta concentración de ^{+}H), el exceso de ^{+}H puede reaccionar con $–COO^{-}$ y forma COOH. Al suceder esto, el grupo ya no presenta carga y no puede interactuar con otros grupos cargados de la proteína, presentándose modificaciones del plegamiento. Además, si esto ocurre en el sitio activo la enzima no podrá unirse al sustrato (Scopes, 1982).

Se determinó la actividad del extracto enzimático obtenido el mismo día de la fermentación, hasta las 4 horas, obteniéndose un incremento de la actividad hidrolítica de 7.3 U/ml, Figura 3-5 y una actividad de transferencia de 7 U/ml, Figura 3-6, anexo A.

Figura 3-5: Actividad hidrolítica de la dextransacarasa del extracto recién obtenido.

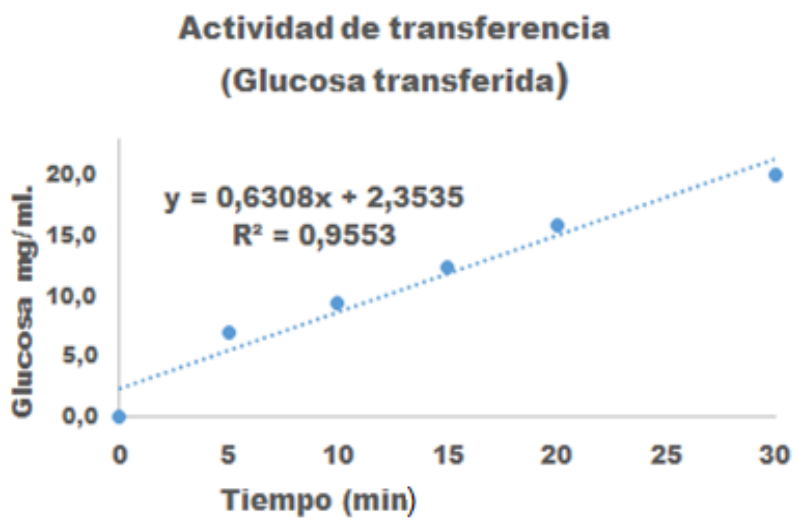


Estos datos son más altos, pero fueron obtenidos bajo condiciones diferentes de fermentación que los reportados en la actividad de la enzima dextransacarasa de *L. mesenteroides* cepa T3 de 3,1 U/ml (Miljkovic *et al.*, 2017), *L. mesenteroides* cepa NRR-640 de 5,9 U/ml (Purama and Goyal, 2007), *L. mesenteroides* cepa NRRL B-512F de 6,7 U/ml (Goyal and Katiyar, 1997).

Muchos factores afectan el rendimiento de la enzima dextransacarasa como cantidad de

inoculo, la fuente de nitrógeno (extracto de levadura), fuente de carbono (porcentaje), temperatura, concentración de fosfatos y el pH (Rodrigues, Lona and Franco, 2003; Al-doori, Aboud and Sedrah, Z, 2015).

Figura 3-6: Actividad transferencia de la dextransacarasa del extracto recién obtenido.



Algunos investigadores han observado perdida de la actividad de la enzima dextransacarasa durante el requipe de las cepas, presentando problemas de estabilidad de la enzima (Sanchez *et al.*, 1999). Trabajos de investigación realizadas con la cepa IBUN 91.2.98, estudiaron el efecto del número de generaciones sobre la producción de la enzima en 40 subcultivos, correspondientes a 196 generaciones, confirmando que hasta ese número de generaciones no se presentó variaciones en la cepa en la producción del extracto enzimático (entre 4 y 6 U/ml), alcanzado al final de la fase exponencial del cultivo (Buitrago Hurtado *et al.*, 2013).

3.2.2 Purificación y análisis electroforético de la enzima dextransacarasa.

La concentración del preinóculo de 1 µl/ml (crioconservado/ml de medio) para las fermentaciones durante un tiempo de incubación de 12 horas a 30 °,150 r.p.m, podría haber sido inconveniente para obtener una biomasa bacteriana suficiente para la lograr buena producción inicial de proteína, obteniendo en el extracto enzimático (crudo) una

concentración de proteínas de 0,189 mg/ml, Tabla 3-1. Las proteínas totales del extracto inicial (crudo) fue de 56.7 mg y pasó a 14.52 mg en el ultrafiltrado debido a la eliminación por la ultrafiltración de solidos suspendidos en el medio no retenidos por la membrana de 50 kDa, como el extracto de levadura, fuente de péptidos, aminoácidos y otras proteínas menores de 50 kDa, (Gaudreau *et al.*, 1999; Lutz, 2015).

La actividad enzimática promedio del extracto crudo (inicial) fue de 5,8 U/ml y disminuyó en el ultrafiltrado a 2,6 U /ml. La actividad específica del extracto crudo fue de 31 U/mg y con el ultrafiltrado 21 U/mg. Los resultados se pueden ver en la Tabla 3-1 y en el anexo E.

Tabla 3-1: Purificación de la enzima dextransacarasa.

Las proteínas[1] fueron determinadas por fluorometría (Qubit) y las proteínas totales[2] fueron calculadas multiplicando las proteínas en mg/ml por el volumen (ml).
La actividad[3] U/ml: Se determinó con el método del ácido dinitrosalicílico y método de la glucosa Oxidasa y la actividad (U)[4] se obtuvo multiplicando la actividad U/ml por el volumen (ml).
La actividad específica[5] se obtuvo dividiendo el total de la actividad enzimática sobre el total de proteínas.

Etapas	Volumen (ml)	Proteínas[1] (mg/ml)	Proteínas totales[2] (mg)	Actividad[3] (U/ml)	Actividad[4] (U)	Actividad Específica[5] U/mg
Extracto crudo	300	0,189	56,7	5,8	1740	31
Ultrafiltración	120	0,121	14,52	2,6	312	21

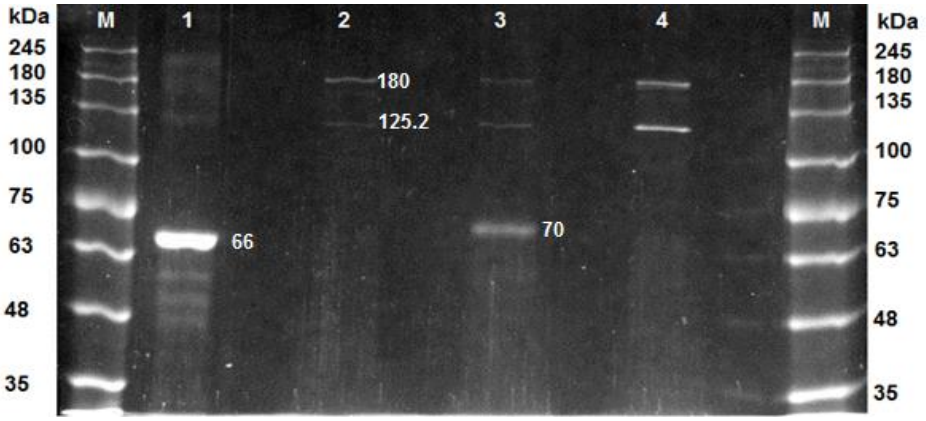
La ultrafiltración se dificultó debido a la adherencia del dextrano aproximadamente de 1000 kDa a la membrana de los tubos de 50 kDa. La enzima forma un complejo y agregados de enzima con el dextrano, obstaculizando el flujo de la muestra a través de la membrana y dificultando la obtención de una enzima concentrada e interfiriendo en la obtención de una muestra adecuada para los análisis y afectando los resultados (Funane *et al.*, 1995; Bisswanger, 2011).

La ultrafiltración no concentró la enzima como se esperaba debido a la asociación fuerte de la enzima con el producto dextrano (Naessens *et al.*, 2005). Además, las membranas de ultrafiltración se ensucian durante el proceso, debido principalmente a las moléculas retenidas por la membrana. El fenómeno de ensuciamiento viene determinado por las interacciones entre las moléculas de suciedad y entre dichas moléculas y la superficie de la membrana (Corbatón, 2015). El fenómeno de ensuciamiento tiene lugar una

acumulación de las moléculas de soluto en las proximidades de la superficie de la membrana (polarización). El aumento de concentración de soluto en las inmediaciones de la membrana como consecuencia de la polarización por concentración puede dar lugar a la formación de una capa sobre la superficie de la membrana. Se ha investigado los parámetros que influyen en la disminución del flujo y el mecanismo de ensuciamiento durante la ultrafiltración de proteínas. Dos fenómenos intervienen, la interacción de proteína–proteína que estimula la agregación de proteínas en solución o sobre la membrana y la interacción de proteína-membrana, que influyen en las tasas de permeación a través de poros (taponamiento, estrechamiento de poros, o deposición de tortas). Generalmente, la deposición de solutos puede ser causada por agregación de proteínas, adsorción, hidrofobicidad, efecto del pH, sales disueltas y de la concentración de la alimentación inicial (Lim and Mohammad, 2012).

Los extractos se analizaron mediante electroforesis en SDS-PAGE para verificar la pureza de la enzima dextransacarasa. El extracto enzimático obtenido (numeral 2.2.2) y el extracto ultrafiltrado (numeral 2.4) fue monitoreado por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS). En la Figura 3-7, se aprecia la formación de bandas características de la enzima dextransacarasa con un peso molecular de aproximadamente 125,2 y 180 kDa.

Figura 3-7: Análisis de la enzima dextransacarasa mediante electroforesis SDS-PAGE.



M: marcador de peso molecular Opti-Protein XL. Línea1: albúmina de suero bovino, Sigma (66 kDa). Línea 2: extracto enzimático. Línea 3: extracto enzimático con dextranasa comercial, Novozymes (E.C 3.2.1.11). Línea 4: extracto enzimático concentrado usando membranas con un peso molecular de corte (MWCO) de 50 kDa.

Estudios anteriores han reportado que la dextransacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* B-512 F tiene un peso molecular aproximado de 170 y 177 kDa y que la proteína de un peso molecular de 177 kDa iban desapareciendo en el SDS-PAGE y se visualizaba más la presencia de una proteína de 158 kDa durante el proceso de almacenamiento (Funane *et al.*, 1995).

En 1994 Kim D y Robyt Jhon F, encontraron que la enzima dextransacarasa constitutiva de *Leuconostoc mesenteroides* B-512 FMC estaba compuesta por tres subunidades (65, 62, 57 kDa), dando un peso total de 184 kDa (Kim and Robyt, 1994b). En nuestro caso se presentan dos bandas de 178,4 a180 y de 122 a 125,2 kDa.

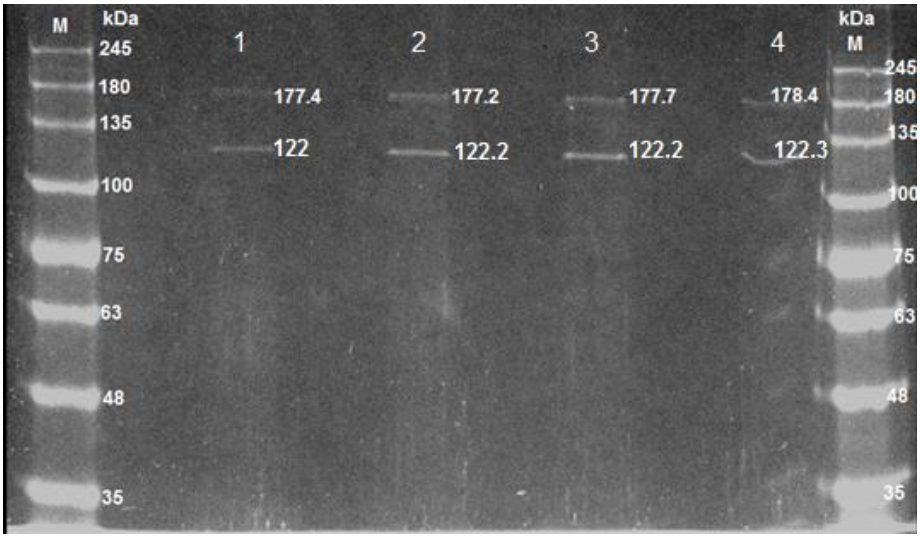
La presencia de dos bandas en el perfil electroforético puede ser debido a un proceso proteolítico reportado por investigadores, en donde encontraron los efectos proteolíticos en los extractos enzimáticos de la enzima almacenada a un pH de 5.2 a 4°C durante 6 días, mediante análisis de Western Blot empleando anticuerpos Anti- dextransacarasa y visualizaron la presencia de bandas de 75, 100, 150 kDa o menos de 150, debido al proceso proteolítico que sufre la enzima con pérdida de actividad enzimática. Ellos concluyen que la enzima dextransacarasa puede ser degradada por proceso autocatalítico o por proteasas exógenas (Mellano, 2009).

Otros investigadores estudiaron la presencia de proteasas en el sobrenadante de un cultivo concentrado de *L. mesenteroides* en SDS-PAGE, encontrando una banda con actividad proteolítica de 30 kDa. Además, después de la ultrafiltración se eliminaron algunos residuos de la proteasa de 30 kDa y se observó actividad proteolítica en el retenido con la fracción de dextransacarasa (Sanchez *et al.*, 1999).

La enzima dextransacarasa obtenida podría estar fuertemente asociada a las proteasas implicadas en el proceso proteolítico que sufre la enzima reportada por investigadores, presentándose dos bandas características con disminución de su estabilidad y actividad. En la literatura existe información de proteasas unidas fuertemente a proteínas (North and Beynon, 2001)

Para obtener un peso molecular aproximado, se realizó la electroforesis con varios extractos ultrafiltrados que mostraron la presencia de dos bandas de proteínas de aproximadamente 122 a 178,4 kDa, Ver Figura 3-8.

Figura 3- 8: Electroforesis (SDS-PAGE) de la enzima ultrafiltrada.



M: marcador de peso molecular Opti-Protein XL. Líneas 1- 4: Extractos enzimáticos concentrado en membranas con un peso molecular de corte (MWCO) de 50 kDa, se visualiza bandas características de la enzima dextransacarasa. Línea 1, 177.4 kDa. Línea 2, 177,2 kDa. Línea 3, 177.7 kDa. Línea 4, 178.4 kDa.

Los resultados son consistentes con los reportados por varios investigadores como Purama y Goyal, encontrando una forma activa de la enzima de dextransacarasa de *Leuconostoc mesenteroides NRRL* B-640 purificada de aproximadamente 180 kDa (Purama and Goyal, 2008a) y los reportes obtenidos con *Sanchez et al*., (1999) quienes obtuvieron una DS de *L. mesenteroides* B-512 F purificada de 184 kDa.

Los investigadores creen que la presencia de diferentes formas de masas moleculares de dextransacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* puede ser proteólisis por proteasas, condiciones de almacenamiento del extracto enzimático (tiempo, temperatura) y de los métodos empleados para su obtención y purificación de la enzima (Sanchez et al., 1999), observándose en la figura 3-7 y 3-8 dos bandas características de la enzima en el extracto. Flórez encontró similares resultados en el análisis electroforético de la dextransacarasa, un peso molecular de 170.1 kDa (Flórez, Buitrago and Ospina, 2018) .

Los datos obtenidos del peso molecular de la enzima dextransacarasa en las electroforesis de la Figura 3-7 (180 kDa) y 3-8 (177.2,178.4), son aproximadamente similares a los pesos moleculares de 177 kDa, 173 kDa, 184 kDa de la electroforesis de la enzima dextransacarasa del *Leuconostoc mesenteroides* NRRL- 512F (Miller and Robyt, 1986; Kim and Robyt, 1994a; Sanchez, 2000).

La enzima dextransacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* B-512F mostró en un zimograma, tres bandas con actividad y con un peso molecular de 170, 155, 129 kDa (Argüello *et al.*, 2005). De igual forma, se ha propuesto que valores mayores a 170 kDa encontrados para la enzima se puede deber a la presencia del dextrano en las preparaciones que interfiere en la migración de la proteína en SDS-PAGE (Kim and Robyt, 1994b; Sanchez, 2000).

3.2.3 Inmovilización de la enzima en Sephadex G-100

Al determinar la actividad enzimática empleando los biocatalizadores de 33 mg/ml y 100 mg/ml y como sustrato sacarosa al 16% (Flórez, 2014), los resultados fueron 0,051 U/ml y 0,076 U/ml y un rendimiento de 1.96% y 2.92% respectivamente, siendo bajos. Las dificultades en la concentración de la enzima durante la ultrafiltración con disminución de la actividad de la enzima pueden haber afectado los resultados de inmovilización. La relación enzima soporte fue de 1-3 µg/mg de soporte. Los resultados se pueden mirar en la Tabla 3-2, anexo G.

Tabla 3-2: Actividad y rendimiento de la enzima inmovilizada en Sephadex G-100.

Cantidad de Sephadex[1] empleado para inmovilizar 30 ml de extracto enzimático purificado.
Proteínas (µg/ml)[2] determinadas por fluorometría utilizando el kit de proteínas de Qubit.
El rendimiento de la actividad[3] se calculó dividiendo la actividad de la enzima inmovilizada sobre la actividad de la enzima ultrafiltrada usada para la inmovilización por 100. Esta se determinó teniendo en cuenta la actividad hidrolítica (Anexo E).

Cantidad de Sephadex[1]. G-100 (mg/ml)	Actividad (U/ml)	Proteínas[2] (µg/ml)	Actividad Total (U)	Rendimiento[3] de actividad (%)
33	0.051	6.1	1.53	1.96
100	0.076	16.8	2.28	2.92

Las enzimas son específicas, y el sitio activo puede acomodar solo una molécula de sustrato específico. En concentraciones altas de sacarosa, que puede haber ocurrido al haber utilizado el sustrato sacarosa al 16%, el acercamiento de varias moléculas de sustrato al mismo tiempo evita que cualquiera acceda al sitio activo, ocurriendo una inhibición por sustrato.

No se realizó el análisis de adsorción del Sephadex G-100 para medir el área de superficie específica (m^2/g) y la distribución del tamaño de los poros. Algunos autores reportaron un tamaño de poro del Sephadex G-100 de 60 Å (Paradossi *et al.*, 2004).

Para realizar una inmovilización se debe escoger una matriz con un área de superficie alta para lograr una mayor interacción enzima-soporte (alta carga enzimática), tamaño de la partícula y una buena porosidad que facilite el contacto de la enzima con el sustrato (David, Yang and Wang, 2011).

El rango de fraccionamiento del Sephadex G100 es de 4 a 150 kDa entrando a los poros proteínas de peso molecular menor o iguales a 150 kDa y de polisacáridos de hasta 100 kDa, siendo el peso molecular promedio de la enzima aproximadamente de 170 kDa de la enzima y del dextrano de 1000 kDa no entrando en el interior de los poros y por lo tanto la inmovilización ocurriría en la superficie del soporte.

El producto de la reacción dextrano provoca un microambiente con alta viscosidad que limita la accesibilidad de la enzima al sustrato dando como resultado una baja actividad enzimática y rendimiento.

Los resultados obtenidos son parecidos a los encontrados en la inmovilización de la dextransacarasa B-512FMC donde hallaron que la presencia de dextrano (0,1% o mayor) con la enzima, afecta la cantidad de enzima adsorbida en el soporte Sephadex. Igualmente, la adsorción de la enzima decreció en presencia de dextrano de alto peso molecular (Kim and Robyt, 1994b) .

Investigadores inmovilizaron la enzima dextransacarasa en perlas silice amidas con aminopropiltrietoxisilano, encontrando que el dextrano de muy alto peso molecular

producido por la enzima causó taponamiento de los poros del soporte y el aumento de viscosidad indujo a una alta resistencia a la transferencia de masa intraparticular (Monsan et al., 1987). El dextrano limita la inmovilización en la superficie de los soportes y dentro de los poros del soporte.

La baja afinidad de la enzima a las perlas de Sephadex G100 obtenida en los resultados con actividad y rendimiento bajos fue estudiada en la producción de la enzima dextransacarasa unida al dextrano (complejo enzimático) mostrando baja afinidad por las perlas de Sephadex G-200. Los investigadores produjeron la dextransacarasa (libre de dextrano) cultivando una cepa mutante constitutiva de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F en un medio con glucosa y observaron que la inmovilización de la enzima era más efectiva, obteniendo una actividad especifica del 80% sin la presencia de dextrano. Los investigadores concluyen que el dextrano endógeno presente en el complejo enzima-dextrano producido en un medio con sacarosa podría inhibir la unión de la enzima a las perlas (Han, Kang and Robyt, 2005).

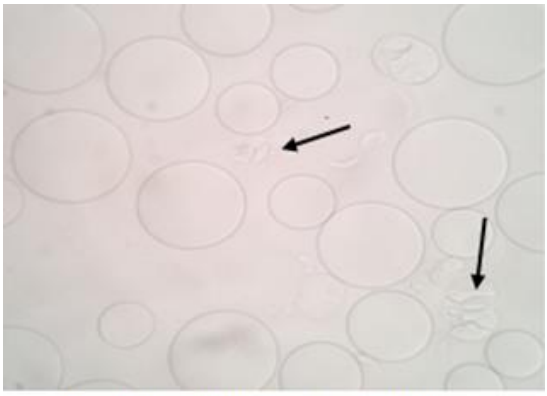
La baja inmovilización fue debida posiblemente a la concentración inicial baja de proteína y a la presencia del dextrano presente en el complejo enzimático que impidió las interacciones de la enzima con el soporte. Además, la inmovilización por adsorción física forma enlaces muy débiles que pueden haberse afectado por el pH del medio que altera la superficie de las cargas de las proteínas y el soporte. Las enzimas inmovilizadas por adsorción sobre la superficie tienden a separarse del soporte debido a las interacciones moleculares débiles entre la enzima y el soporte que puede ser destruidas por acciones mecánicas, fuerzas iónicas o por el pH (Cao, 2006).

Novick y Rozzell dicen que la mayoría de los soportes a base de carbohidratos, tales como celulosa, agarosa y dextrano, tienen poca estabilidad mecánica comparados con otros soportes. Además, por ser polisacáridos naturales pueden contaminarse y degradarse por la acción microbiana disminuyendo la resistencia del soporte (Novick and Rozzell, 2005).

Algunas de las partículas de Sephadex G-100 empleadas en la inmovilización para obtener el biocatalizador se deformaron y fracturaron ante la agitación suave mecánica durante la inmovilización de la enzima, como en el control. El sephadex utilizado se encontraba hidratado, almacenado a 4°C durante mucho tiempo y la estructura de las perlas puede

haber sido afectada por contaminación microbiana, que debilitó la integridad de la matriz, ver Figura 3-9.

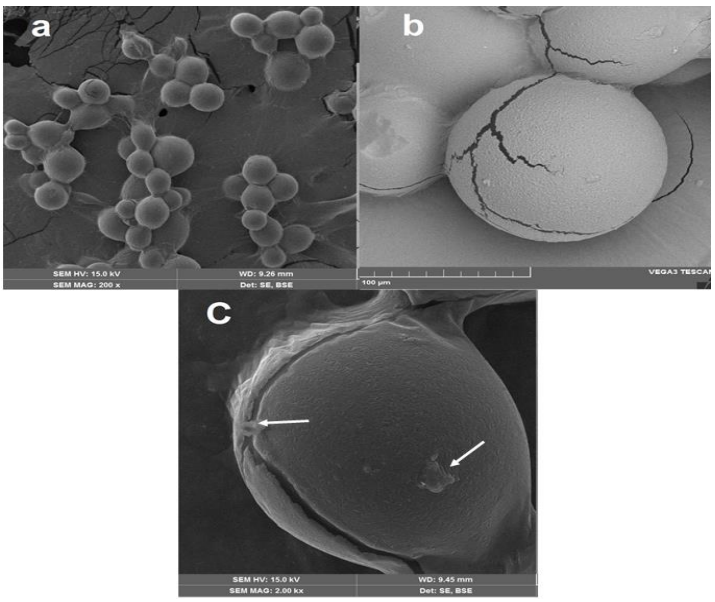
Figura 3- 9: Perlas en Sephadex G-100 (10X).



Las flechas indican perlas destruida

La microscopia electrónica de barrido (SEM) del biocatalizador muestra perlas de diferente tamaño, con grietas y con poca presencia de dextrano, Figura 3-10.

Figura 3-10: Imágenes de microscopia electrónica de barrido (SEM) de las perlas de Sephadex G-100



a. Perlas de sephadex de diferentes tamaños con aumento de 200 X
b. Perlas con fisuras observada en 1000 X.
c. Perla con grieta y algo de dextrano observada en 2000 X.

Murase observó la fragilidad de las perlas de los geles de Sephadex, los cuales se destruían cuando eran empaquetadas en tubos capilares para ser observadas en difracción de rayos X , (Murase *et al.*, 2018).

Empleando el programa Image J se midió el diámetro aproximado de las perlas de Sephadex G-100 y fueron analizadas mediante el programa Origin 8, dando el promedio aproximado de 115 µm con una desviación estándar de 0,098, observándose no cambios significativos con el tamaño de las perlas, ver el anexo I.

3.2.4 Inmovilización de la enzima con Eupergit CM

La inmovilización realizada en Eupergit CM con un tamaño de partículas de 50-300 µm, a 4°C por espacio de 72 horas y en agitación 70 r.p.m dio una baja actividad y un rendimiento menor al 1% (Tabla 3-3), datos en el anexo G. La relación enzima soporte fue entre 0,2 y 1 µg/ mg soporte.

Tabla 3-3: Actividad y rendimiento de la enzima inmovilizada en Eupergit CM.

Cantidad de Eupergit[1] utilizado para inmovilizar 30 ml de extracto enzimático purificado.
Proteínas (µg/ml)[2] se determinaron por Qubit.
El rendimiento de la actividad[3] se determinó dividiendo la actividad de la enzima inmovilizada sobre la actividad de la enzima ultrafiltrada por 100.

Cantidad de Eupergit[1] (mg/ml)	Actividad (U/ml)	Proteínas[2] (µg/ml)	Actividad Total (U)	Rendimiento[3] (%)
100	0,052	5,5	1,56	2
500	0,054	18	1,62	2,08

Según la literatura, los estudios realizados sobre la inmovilización de la dextransacarasa no han tenido éxito obteniéndose baja estabilidad y rendimiento. Una de las causas de la baja actividad es la producción del dextrano asociado con la enzima que cubre los sitios reactivos de la enzima bloqueando el acceso a los grupos aminos libres de la enzima con los grupos oxiranos de la superficie del Eupergit, que forman múltiples uniones, afectando la inmovilización de la dextransacarasa.

Guisan et al, propusieron dos mecanismos para la unión de la enzima dextransacarasa al soporte: en la primera, la enzima es adsorbida en la superficie del soporte por interacciones

hidrofóbicas, lo cual es bloqueado por la presencia del dextrano y en la segunda etapa, la proteína adsorbida se une covalentemente a los grupos epóxidos del soporte (Boller, Meier and Menzler, 2002).

La inmovilización de dextransacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F en alginato de sodio se optimizó en un reactor de lecho fluidizado con el fin de permitir la formación continua de oligosacáridos demostrando que la baja actividad de la enzima inmovilizada está asociada estrechamente al polímero dextrano. Un extracto enzimático con un contenido de dextrano mayor del 90% se obtiene un bajo rendimiento de la enzima inmovilizada debido a las limitaciones difusionales. Según algunos investigadores, esto puede ser resuelto disminuyendo la producción de la cantidad de dextrano o reduciendo el tamaño del dextrano realizando hidrolisis enzimática. Berensmeier et al, reportaron que una baja concentración de dextrano (5%), es suficiente para inmovilizar, estabilizar y reducir las limitaciones difusionales (Berensmeier *et al.*, 2004).

Con el fin de solucionar el problema de la presencia del dextrano, se han realizado hidrolisis del dextrano mediante el tratamiento del extracto enzimático con la enzima dextranasa fúngica e inmovilizando en Eupergit C y Eupergit C 250 L, obteniendo una máxima actividad específica con el Eupergit C de 226 U/g de biocatalizador y con el Eupergit C 250 L de 710 U/ g de biocatalizador (Gómez de Segura *et al.*, 2004).

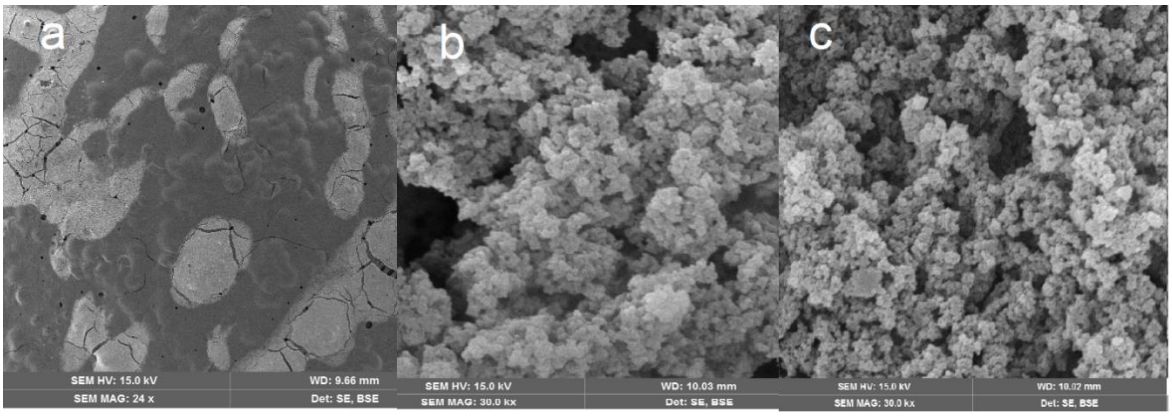
Durante la ultrafiltración del extracto enzimático, se pudo visualizar que cierta cantidad de dextrano, producto de la reacción enzimática durante la fermentación, quedó en el fondo de la membrana de los tubos Amicon, perdiéndose proteína y observándose una pérdida considerable de actividad. El dextrano endógeno o dextrano unido a la enzima dextransacarasa o llamado complejo enzima- dextrano, tiene efecto en la actividad y estabilidad de la enzima dextransacarasa (Willemot, Monsan and Duran, 1988).

Según algunos autores, la enzima puede perder actividad durante la inmovilización, empleando soportes con grupos funcionales epoxi o aldehídos debido a que ciertos aminoácidos responsables de la estructura terciaria de la enzima (lisina, histidina, ácido aspártico y glutámico) podrían reaccionar con los grupos funcionales de los soportes

empleados para inmovilizar dando un bajo rendimiento de actividad (Parlak, Ustek and Tanriseven, 2013; Terrasan, De Morais Junio and Contesini, 2019).

Se realizó la microscopia electrónica de barrido (SEM) del biocatalizador con diferentes magnificaciones bajas (24 X, 200X) y altas (1.000 X, 4.000 X, 10.000 X, 30.000 X). La micrografía mostró formas esféricas de tamaño variado y con apariencia poco definida que no permitió determinar el diámetro de la partícula, Figura 3-11(a).

Figura 3- 11: Imágenes de microscopia electrónica de barrido del Eupergit CM.



a. Micrografía del biocatalizador (25X). b. Control (Eupergit en buffer fosfato 50 mM).
c. biocatalizador (Eupergit más el extracto enzimático).

En el nivel de magnificación alta no se observó cambios en la morfología del soporte, probablemente por la ausencia de actividad enzimática obtenida, no visualizando la presencia de dextrano. Los resultados de actividad enzimática baja, rendimiento bajo y la visualización de la microscopia electrónica de barrido, muestran lo ineficaz que fue la inmovilización de la enzima en el Eupergit CM. En altas magnificaciones (30.000 X), se observó la morfología de agregados, la superficie porosa de la matriz similar al control, Figura 3-11(b, c).

4. Conclusiones

Se identificó la cepa IBUN 91.2.98 por medio de la secuenciación parcial de los genes 16S RNAr con un porcentaje de similitud mayor del 99% correspondiendo a *Leuconostoc mesenteroides*.

Durante el proceso de fermentación hasta las 6 horas se disminuyó el pH del medio, desde 7,2±0,01 hasta 4,2, observándose en los extractos enzimáticos obtenidos a las 5 y 6 horas de fermentación, disminución de la actividad hidrolítica y no se pudo determinar la actividad de transferencia. La actividad de los extractos obtenidos hasta las cuatro horas de fermentación y realizada inmediatamente sin almacenamiento, permitió obtener una actividad hidrolítica de 7,3 U/ml y una actividad de transferencia de 7 U/ml.

Las fermentaciones hasta las cuatro horas y realizadas en un medio con concentración de fosfatos 0,1 M, bajo las siguientes condiciones de inoculo (1 µ del crioconservado de microorganismo por ml de medio), sacarosa al 6%, 30 °C, 150 r.p.m y sin control del pH, se logró obtener una actividad enzimática promedio de 5.8 U/ml.

La purificación de la enzima es compleja por la presencia del polímero dextrano (1000 kDa) asociado estrechamente a la enzima (complejo enzima- dextrano) y por los componentes del medio que se depositaron en el fondo de la membrana, afectando la recuperación de un concentrado óptimo, presentándose pérdida de actividad.

La electroforesis de proteínas de los extractos crudos y purificados mostró bandas características de la enzima dextransacarasa con peso molecular de 122 a 125 KDa y la otra banda de 177 a 180 kDa, coincidiendo con los hallazgos reportados por otros investigadores.

La inmovilización en Sephadex G-100 fue ineficiente y probablemente se afectó por la disminución de la actividad de la enzima del extracto ultrafiltrado, por la presencia del producto dextrano, resultado un biocatalizador con un rendimiento de inmovilización muy bajo. Además, el soporte mostró una pobre estabilidad mecánica, observándose ruptura de las perlas.

La inmovilización de la enzima en forma covalente con el Eupergit CM fue ineficaz, por la disminución de proteínas con pérdida de actividad en el ultrafiltrado y por la presencia de dextrano de alto peso molecular, obteniéndose una baja actividad y rendimiento de inmovilización.

Fue posible realizar la producción de la enzima dextransacarasa y se incursionó en la inmovilización de la enzima, encontrando dificultades debidas a las características del producto dextrano de alto peso molecular unido fuertemente a la enzima, que hace muy difícil el proceso de inmovilización.

5. Recomendaciones

Optimizar el rendimiento de la biocatálisis de la enzima dextransacarasa teniendo en cuenta factores específicos como cantidad de microorganismo, tiempo de fermentación, pH, concentración de sacarosa, concentración de extracto de levadura, concentración de fosfatos, concentración de calcio, agitación y aireación.

Estudiar la estabilidad de la enzima dextransacarasa almacenada a 4º C con un pH de 5,2-5,4 en diferentes tiempos, determinando actividad enzimática y pH.

Eliminar los problemas de la inmovilización asociado a la presencia del dextrano,
Empleando una enzima hidrolítica que hidrolicé el dextrano del complejo enzima-dextrano o utilizar en las fermentaciones una cepa mutante constitutiva que produzca la enzima libre de dextrano.

Se debe continuar investigando la inmovilización de la enzima dextransacarasa por el gran interés en el desarrollo de un biocatalizador robusto con un mejor rendimiento debido a sus amplias aplicaciones en la industria alimentaria, productos farmacéuticos, química fina y su potencial prebiótico. Al aumentar su estabilidad en condiciones adversas (pH, temperatura), disminuiría los costos de producción por su reutilización. Además, se concentraría la enzima y se podría separar de la mezcla de reacción, simplificando el proceso de producción y aumentando la facilidad de operacional y control del proceso.

Los resultados obtenidos aportarán información para mejorar y corregir futuros estudios de la enzima inmovilizada, debido a sus múltiples aplicaciones. El crecimiento del mercado anual de las enzimas es aproximadamente del 4,6%, superando los $ 5 billones de dólares y esperado que alcance los $17.5 billones en el 2024.

Anexo A: Determinación de la actividad enzimática de la enzima DS

Se determinaron las actividades enzimáticas la hidrolítica y/o la de transferencia.

Equipos

- Plancha de calentamiento
- Baño termostatado de recirculación
- Baño de agua Memmert
- Espectrofotómetro
- Centrífuga
- Cronómetro

Materiales

- Reactor de enchaquetado vidrio y magneto
- Vaso de precipitado
- Eppendorf de 1,5 ml
- Tubos de vidrio
- Micropipetas de volumenes variados

Reactivos

- Ácido dinitrosalicílico, anexo B
- Kit de glucosa GOD-POD, Spinreact, anexo C
- Extracto crudo o ultrafiltrado
- Sustrato sacarosa con una concentración de 160 mg/ml en buffer fosfato 50 mM a un pH 5,2-5,4. Almacenar congelado en frasco estéril para evitar la contaminación.

Procedimiento

Reacción enzimática

- Dejar que el baño de recirculación llegue a 30°C.
- Agregar 2 ml de sustrato en un frasco vial de vidrio con un magneto pequeño y colocarlo dentro del reactor enchaquetado. Conectar la manguera del baño de recirculación al reactor y dejar 5 minutos para atemperar.
- Alistar el cronómetro y pulsarlo inmediatamente que se adicionan 2 ml de extracto enzimático al sustrato (numeral 2.2.2), tiempo cero. Tomar muestras (300 µl) en diferentes tiempos en minutos (0, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50). Inactiva colocando el eppendorf en un flotador y dejar en agua en ebullición por espacio de 5 minutos. Enfriar en hielo los eppenforf y centrifugar a 14.000 r.p.m por 1 minuto.

Debido a la reacción enzimática hay un aumento en la viscosidad de la mezcla de reacción dificultado la toma de la muestra y una mejor succión de la muestra se logró cortando la punta.

Determinación de la reacción enzimática.

- La determinación de la reacción enzimática de las muestras se realizó por triplicado.
- Marcar tubos, uno como blanco, otro para la solución de glucosa (0,5 mg/ml) y los otros con los tiempos de reacción (0,5, 10,15, 20, 30, 40, 50).
- Realizar diluciones de los tiempos de reacción en agua destilada, dependiendo de la concentración de azúcares reductores o de glucosa presentes en la muestra. Para una dilución 1:22, agregó en cada tubo de ensayo 525 µl de agua destilada y 25 µl de muestra. Estos tubos serán para la determinación de DNS.
- Marcar otros tubos como blanco, solución de glucosa (0,5 mg/ml) y con los tiempos de reacción. Colocar en los tubos marcados con los tiempos de reacción 50 µl de agua destilada y tomar 50 µl de las diluciones 1:22, quedando con una dilución 1:44. Hacer dilución 1:10 del patrón del kit de glucosa (GOD-POD) de100 mg/dL y de la solución de glucosa (0,5 mg/ml). Estos tubos se utilizan para la determinación de la Glucosa.

- El volumen final de la dilución de los tubos marcados en los tiempos de reacción para DNS es de 500 µl. Agregar 500 µl de agua destilada al tubo marcado como blanco y 500 µl de la solución (0,5 mg/ml) al tubo marcado como solución de glucosa. Adicionar a todos los tubos, 500 µl de reactivo de DNS y colocar en la gradilla en el baño húmedo por 5 minutos a temperatura de ebullición. Retirar y dejar enfriar en hielo protegidos de la luz y leer contra el blanco a una longitud de onda de 540 nm (DO_{540}).
- Calcular la concentración de azúcares reductores (DNS), utilizando la respectiva curva de calibración, anexo B.
- Para la determinación de la glucosa, se utilizan los tubos de tiempo de reacción que contiene 100 µl de la dilución 1:44, empleando la metodología de glucosa oxidasa (GOD-POD), anexo C. Las diluciones se pueden cambiar, dependiendo de la concentración de azúcares reductores y glucosa presente en las muestras.

Cálculos

Se realiza los cálculos teniendo en cuenta la dilución realizada a las muestras. En este caso se realizó la dilución 1:20 para los azúcares reductores y 1:40 para la determinación de la glucosa, según el anexo B y C. Se reportó las concentraciones en mg/ml.

1. Resultados

A. Resultados de DNS y de glucosa del extracto enzimático antes de ultrafiltrar. Se calculo la actividad hidrolítica, fructosa libre (DNS-KIT) y actividad glucosiltransferasa, glucosa transferida (DNS-2KIT).

Ensayo DNS (Azúcares reductores) 540nm		
Tiempo (minutos)	**Promedio Absorbancias (Abs)**	**Concentración (mg/ml)**
0	0,264	11,41
5	0,31	13,23
10	0,35	14,81
15	0,42	17,58
20	0,54	22,34
30	0,60	24,71

Kit de Glucosa 510nm		
Tiempo (minutos)	**Promedio Absorbancias (Abs)**	**Concentración (mg/ml)**
0	0,48	5,61
5	0,35	4,09
10	0,36	4,21
15	0,42	4,91
20	0,50	5,85
30	0,53	6,20

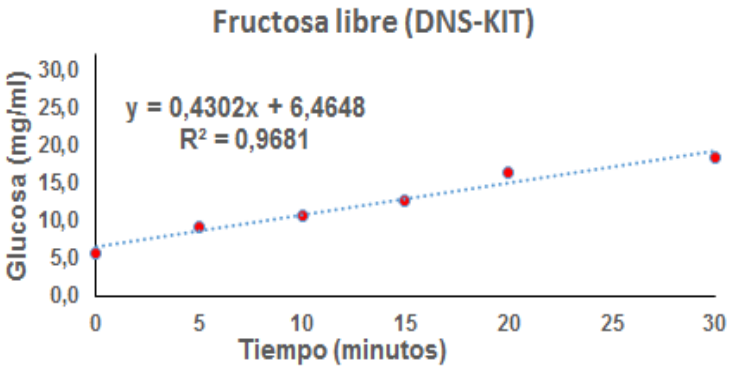
B. Resultados de actividad hidrolítica y de transferencia.

Tiempo (minutos)	DNS-KIT (mg/ml)	DNS-2(KIT) (mg/ml)
0	5,8	0,18
5	9,1	5,04
10	10,6	6,39
15	12,7	7,76
20	16,5	10,64
30	18,5	12,32

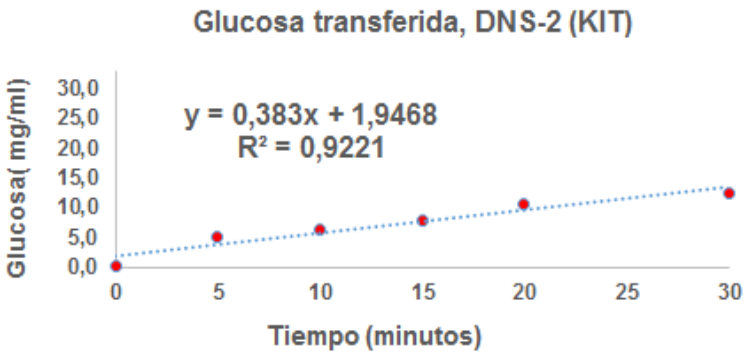
Realizar las gráficas de DNS-KIT y DNS-2(KIT). El tiempo más adecuado para calcular la pendiente en unidades (mg/ (ml*min), fue durante los primeros 30 minutos en donde se obtuvo una mejor regresión lineal cerca de 1.

Determinar la actividad empleando un factor de conversión en U/ml, la pendiente, el volumen total de reacción y el volumen de enzima agregada. En este caso se utilizó 2 ml de sustrato y 2 ml de extracto enzimático, siendo el volumen total de reacción 4ml.

▪Actividad hidrolítica



- Actividad de transferencia



- Las fórmulas (A.1) y (A.2)(Flórez, 2014), para determinar las actividades son las siguientes:
- Actividad hidrolítica (U/ml)

$$\frac{\text{DNS}-\text{KIT}}{\text{Tiempo de reacción}} * \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}*\text{min}}\right) * \left(\frac{1mmol\ glucosa}{180mg}\right)\left(\frac{1000\ \mu\text{mol}}{1\text{mmol}}\right) * 2 \quad \text{(A.1)}$$

- $\frac{\text{DNS}-\text{KIT}}{\text{Tiempo de reacción}}$ = Pendiente de la curva (0,4302)

- $\left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}*\text{min}}\right) * \left(\frac{1mmol\ glucosa}{180mg}\right)\left(\frac{1000\ \mu\text{mol}}{1\text{mmol}}\right) * 2$=conversión a U/ml, multiplicado por 2 (factor de dilución).

- Actividad transferencia (U/ml)

$$\frac{\text{DNS} - 2\text{KIT}}{\text{Tiempo de reacción}} * \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml} * \text{min}}\right) * \left(\frac{1mmol\ glucosa}{180mg}\right)\left(\frac{1000\ \mu\text{mol}}{1\text{mmol}}\right) * 2 \quad (\text{A.2})$$

Reemplazando las ecuaciones y teniendo en cuenta las pendientes.

Pendiente de DNS-KIT: 0,4302 (mg/ml) /min

Pendiente de DNS-2KIT: 0,383 (mg/ml) /min

Actividad hidrolítica del extracto (sin ultrafiltrar): 4,8 U/ml

Actividad transferencia del extracto (sin ultrafiltrar): 4,3 U/ml.

2. Resultados

Datos de la Figura 3-5 y 3-6 para la actividad hidrolítica y de transferencia con el extracto enzimático (sin ultrafíltrar) obtenido a las 4 horas de fermentación del cultivo. La determinación de la actividad se realizó el mismo día de la fermentación.

Ensayo DNS (Azúcares reductores) 540nm		
Tiempo (minutos)	**Promedio Absorbancias**	**Concentración (mg/ml)**
0	0,301	11,74
5	0,347	20,16
10	0,406	23,42
15	0,444	25,53
20	0,519	29,68
30	0,595	33,89

Kit de Glucosa 510nm		
Tiempo (minutos)	**Promedio Absorbancias**	**Concentración (mg/ml)**
0	0,52	5,84
5	0,586	6,58
10	0,623	7,00
15	0,585	6,57
20	0,618	6,94
30	0,621	6,98

Tiempo (minutos)	DNS-KIT (mg/ml)	DNS-2(KIT) (mg/ml)
0	5,90	0,05
5	13,57	6,99
10	16,42	9,42
15	18,96	12,38
20	22,74	15,80
30	26,92	19,94

Reemplazando en las ecuaciones C.1 y C.2 y teniendo en cuenta las pendientes.

Pendiente de DNS-KIT: 0,6606 (mg/ml) /min

Pendiente de DNS-2KIT: 0,6308 (mg/ml) /min

Actividad hidrolítica (sin ultrafiltrar): 7,3 U/ml

Actividad transferencia (sin ultrafiltrar): 7,0 U/ml.

3. Resultados

Datos de la determinación de la actividad hidrolítica realizada a las 4, 5 y 6 horas de fermentación del medio, Figura 3-4.

A. Cuatro horas de fermentación.

Ensayo DNS (Azúcares reductores) 540nm		
Tiempo (minutos)	**Promedio Absorbancias**	**Concentración (mg/ml)**
0	0,278	10,89
5	0,265	15,61
15	0,405	23,37
20	0,43	24,75
30	0,491	28,13

Kit de Glucosa 510nm		
Tiempo (minutos)	**Promedio Absorbancias**	**Concentración (mg/ml)**
0	0,48	8,42
5	0,43	7,54
15	0,598	10,49
20	0,61	10,70
30	0,578	10,14

Tiempo (minutos)	DNS-KIT (mg/ml)
0	2,47
5	8,07
15	12,88
20	14,05
30	17,99

Pendiente de DNS-KIT: 0,4876 (mg/ml) /min. R^2=0,9469
Actividad hidrolítica: 5,4 U/ml

B. Cinco horas de fermentación.

Ensayo DNS (Azúcares reductores) 540nm		
Tiempo (minutos)	**Promedio Absorbancias**	**Concentración (mg/ml)**
0	0,275	10,78
5	0,297	11,59
15	0,397	15,28
20	0,533	20,31
30	0,535	20,38

Kit de Glucosa 510nm		
Tiempo (minutos)	**Promedio Absorbancias**	**Concentración (mg/ml)**
0	0,576	6,74
5	0,503	5,88
15	0,52	6,08
20	0,612	7,16
30	0,685	8,01

Tiempo (minutos)	DNS-KIT (mg/ml)
0	4,04
5	5,71
15	9,20
20	13,15
30	12,37

Pendiente de DNS-KIT: 0,3124 (mg/ml) /min. R^2=0,8694
Actividad hidrolítica: 3,47 U/ml

C. Seis horas de fermentación.

Ensayo DNS (Azúcares reductores) 540nm		
Tiempo (minutos)	Promedio Absorbancias	Concentración (mg/ml)
0	0,23	9,12
5	0,23	9,12
15	0,22	8,75
20	0,23	9,12
30	0,23	9,12

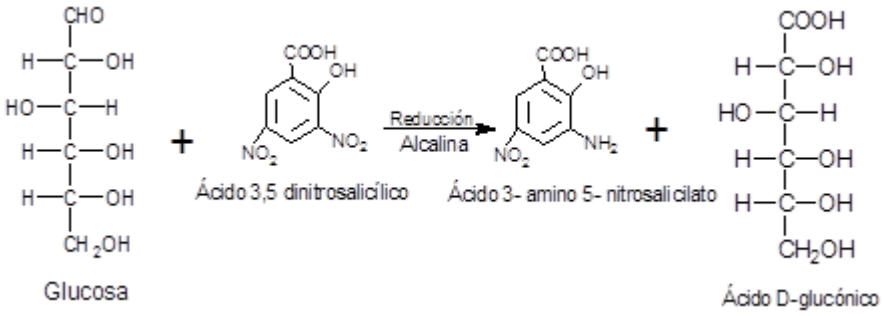
Kit de Glucosa 510nm		
Tiempo (minutos)	Promedio Absorbancias	Concentración (mg/ml)
0	0,545	6,37
5	0,562	6,57
15	0,505	5,90
20	0,531	6,21
30	0,519	6,06

Tiempo (minutos)	DNS-KIT (mg/ml)
0	2,74
5	2,55
15	2,85
20	2,90
30	3,05

Pendiente de DNS-KIT: 0,0137 (mg/ml) /min. R^2=0,7518
Actividad hidrolítica: 0,15 U/ml

Anexo B: Método de DNS (ácido 3,5 dinitrosalicílico)

Fundamento



El método de DNS (técnica de Miller) es una técnica colorimétrica que sirve para cuantificar los azúcares reductores. El ácido 3,5 dinitrosalicílico es un compuesto aromático que reacciona con los azúcares y otras moléculas reductores. El ácido 3,5 dinitrosalicílico (amarillo) se reduce en condiciones alcalinas a ácido 3- amino 5- nitrosalicilato (rojo) y la glucosa es oxidada en ácido glucónico. El ácido 3- amino 5- nitrosalicilato se cuantifica a una longitud de onda de 540 nm (DO_{540}) (Garrida, Almaraz and Marchiaro, 2017).

El procedimiento se realizó con el objeto de obtener una curva de calibración a partir de una solución patrón de glucosa de concentración 2 mg/ml.

Reactivos

1. Solución dinitrosalicílico (DNS)

Reactivo de ácido dinitrosalicílico (DNS).

- Hidróxido de sodio, Carlo Erba 1,6 g
- Tartrato de sodio y potasio 4 H_2O (sal Rochelle), Sigma 30 g

- Ácido 3,5 dinitrosalicílico, sigma 1 g
- D (+) – Glucosa, Merck, 2 mg/ml

Agua destilada completar a 100ml.

Almacenar en un frasco ámbar protegido de la luz.

Curva de calibración

La curva de calibración se realizó por triplicado, empleando el siguiente procedimiento:

1. Hacer soluciones de glucosa a partir de la solución estándar de 2 mg/ml con concentraciones de 0.2, 0.5, 0.8, 1.1, 1.4, 1.7, con un volumen final de 500 µl. Estas concentraciones se obtuvieron, agregando respectivamente en cada tubo 50, 125, 200, 275, 350, 425 µl de la solución de glucosa estándar y se completa con agua destilada a 500 µl. El blanco es 500 µl de agua destilada.

2. Adicionar 500 µl de solución de ácido dinitrosalicílico (DNS) a todos los tubos incluyendo el blanco.

3. Hervir los tubos 5 minutos.

4. Enfriar los tubos en hielo, para parar la reacción.

5. Adicionar a cada tubo 5 ml de agua destilada.

6. Agitar y dejar en reposo 15 minutos.

7. Leer en un espectrofotómetro la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm (DO_{540}).

8. Graficar Absorbancia (eje ordenadas: Y) frente a la concentración de glucosa (eje de abscisas: X) y realizar la regresión lineal y la ecuación de la recta para los cálculos de las muestras.

Resultados

Tabla B-1: Datos de la curva de patrón de glucosa.

Tubos	Glucosa (mg/ml)	Absorbancia			Promedio Absorbancias	Desviación estándar
1	0,2	0,080	0,074	0,077	0,077	0,003
2	0,5	0,230	0,21	0,225	0,222	0,010
3	0,8	0,377	0,367	0,379	0,374	0,006
4	1,1	0,539	0,519	0,522	0,527	0,011
5	1,4	0,693	0,648	0,680	0,674	0,023
6	1,7	0,774	0,754	0,852	0,793	0,052

Figura B-1: Curva con barras de error.

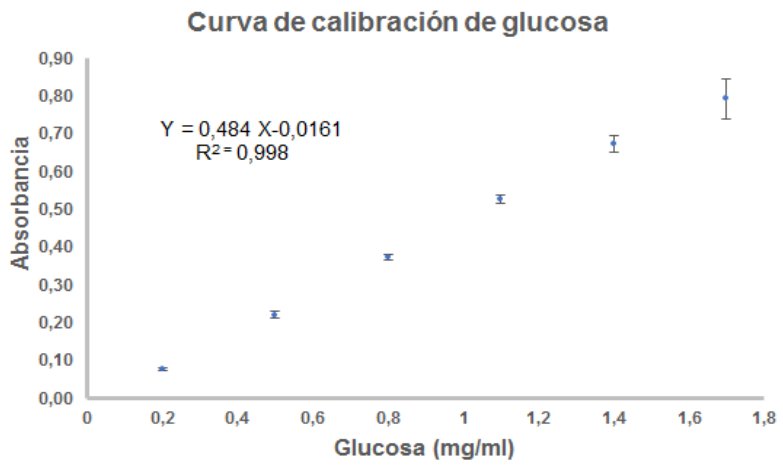


Tabla B-2: Datos de la curva de patrón de glucosa.

Tubos	Glucosa (mg/ml)	Absorbancias			Promedio de absorbancias	Desviación estándar
1	0,2	0,087	0,092	0,09	0,090	0,0025
2	0,5	0,251	0,248	0,256	0,252	0,0040
3	0,8	0,407	0,415	0,425	0,416	0,0090
4	1,1	0,582	0,582	0,584	0,583	0,0012
5	1,4	0,729	0,751	0,784	0,755	0,0277
6	1,7	0,880	0,889	0,906	0,892	0,0132

Figura B-2: Curva con barras de error.

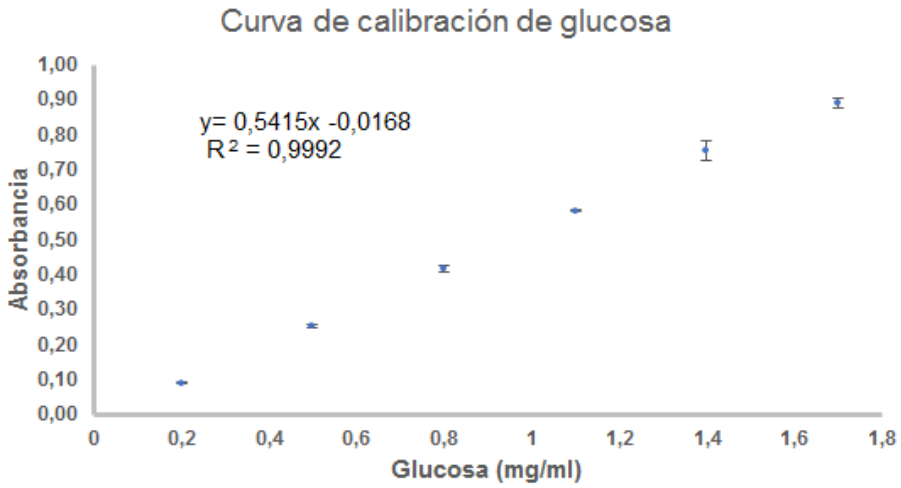


Tabla B-3: Datos de la curva de patrón de glucosa.

Tubos	Glucosa (mg/ml)	Absorbancias			Promedio de absorbancias	Desviación estándar
1	0,2	0,088	0,080	0,070	0,079	0,009
2	0,5	0,227	0,230	0,238	0,232	0,006
3	0,8	0,380	0,374	0,381	0,378	0,004
4	1,1	0,529	0,552	0,504	0,528	0,024
5	1,4	0,678	0,669	0,668	0,672	0,006
6	1,7	0,818	0,854	0,871	0,848	0,027

Figura B-3: Curva con barras de error.

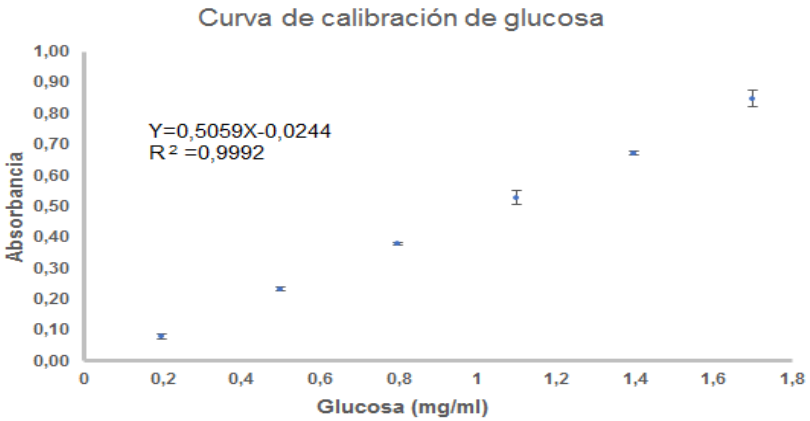
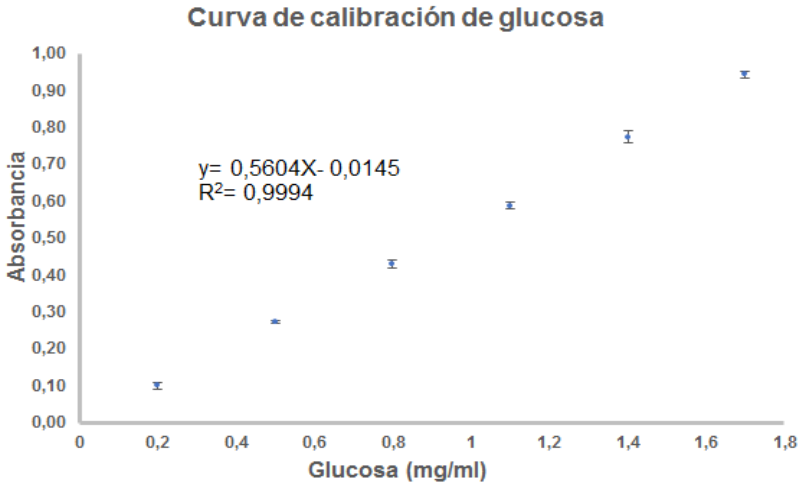


Tabla B-4: Datos de la curva de patrón de glucosa.

Tubos	Glucosa (mg/ml)	Absorbancias			Promedio de absorbancias	Desviación estándar
1	0,2	0,102	0,107	0,09	0,100	0,009
2	0,5	0,275	0,271	0,269	0,272	0,003
3	0,8	0,421	0,429	0,440	0,430	0,010
4	1,1	0,578	0,593	0,591	0,588	0,008
5	1,4	0,779	0,757	0,787	0,774	0,016
6	1,7	0,953	0,941	0,936	0,943	0,009

Figura B-4: Curva con barras de error**.**



Anexo C: Método de Glucosa Oxidasa

Fundamento

La glucosa oxidasa (GOD) cataliza la oxidación de glucosa a ácido glucónico. El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) producido se detecta mediante un aceptor cromogénico de oxígeno, fenol-ampirona en presencia de peroxidasa (POD). La intensidad del color es proporcional a la concentración de glucosa en la muestra analizada. La quinona (rojo) adquiere gran intensidad con la concentración de glucosa y es absorbida a una densidad óptica 510 nm (DO_{510}).

$$\text{B-D-Glucosa} + O_2 + H_2O \xrightarrow{\text{GOD}} \text{Ácido glucónico} + H_20_2$$

$$H_20_2 + \text{Fenol} + \text{Ampirona} \xrightarrow{\text{POD}} \text{Quinona} + H_2O$$

Estabilidad

Todos los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, mantenidos 2-8 °C protegidos de la luz y evitando su contaminación durante su uso. Descartar el reactivo con presencia de partículas, presenta turbidez o la absorbancia del blanco ≥0,10 a 505 nm.

Reactivos

1. R1 (Solución tampón).

- TRIS pH 7,4 (92mmol/L)
- Fenol (0,3 mmol/L)

2. R2 (Enzimas).

- Glucosa oxidasa (GOD) 15000 U/L
- Peroxidasa (POD) 10000 U/L
- 4-Aminofenazona (4-AF) 2,6 mmol/L

3. Patrón de glucosa

El kit incluye un patrón de concentración de 100 mg/dL.

4. Solución de glucosa

Se preparó una solución de glucosa con una concentración de 0,5 mg/ml, empleando la D (+) - Glucosa de Merck.

5. Reactivo de trabajo (RT)

Se disolvió el contenido de un vial marcado como R2 (enzimas liofilizadas) en el frasco tampón marcado como R1. Se tapó y mezcló suavemente hasta disolver el contenido. El reactivo es estable un mes de 2-8 °C.

Procedimiento

Seguir el procedimiento de la Tabla C-1, mezclar y dejar a temperatura ambiente por 15 minutos. Leer contra el blanco a una longitud de onda de 510 nm (DO_{510}).

Tabla C- 1: Determinación de glucosa.

Solución de glucosa[1] (0,5 mg/ml), diluida 1:10 con agua destilada.
Patrón del kit de glucosa[2], GOD-POD (SPINREACT).

Tubo	Agua Destilada (µl)	Patrón (µl)	Solución de glucosa (µl)	Muestra (µl)	Reactivo de trabajo (RT) (µl)
Blanco	100	-	-	-	1000
Glucosa[1] (0,5 mg/ml)	-	-	100	-	1000
Patrón del kit (0,1mg/ml)	-	100	-	-	1000
Muestra de extracto enzimático	-	-	-	100	1000

- Hacer los cálculos (ver Ecuación C.1).(SPINREACT, 2017).

Glucosa (mg/ml)= $\frac{\text{absorbancia muestra}}{\text{absorbancia patrón}} * \text{concentración patrón} * \text{dilución}$ (C.1)

Anexo D: Cuantificación de proteínas empleando el kit de Qubit.

La técnica emplea un equipo fluorómetro Qubit 2.0 de mesa, para la cuantificación de proteínas, DNA, ácidos nucleicos y RNA. El kit incluye un colorante fluorescente naranja específico para la cuantificación de biomoléculas de interés, como las proteínas. El colorante tiene una baja fluorescencia hasta que se une a la proteína, su selectividad y especificidad minimiza el efecto de los contaminantes que se encuentran en las muestras que puede afectar la cuantificación. El ensayo es preciso en concentraciones de las muestras de 12,5 µg/ml a 5 mg/ml. Los reactivos tienen una alta fotoestabilidad y ha mostrado en los ensayos una caída de fluorescencia menor de 0,3% después de nueve lecturas y menor de 2,5% después de cuarenta lecturas.

Su alta sensibilidad permite emplear pequeños volúmenes de 1 µl de muestra, logrando altos niveles de exactitud, aun con muestras diluidas. EL kit incluye el reactivo de Qubit concentrado, buffer de dilución, estándares de BSA (Bovine serum Albumin) prediluidos y tubos de ensayos desechables (thin wall, clear, 0,5 ml tipo PCR) que elimina los pasos de lavado y contaminación cruzada. El equipo procesa los datos en 3 segundos por muestra. La calibración se hace en tres puntos con tres estándares, el estándar número 1 de 0 ng/ µl, el estándar número 2 de 200 ng/ µl y el estándar 3 de 400 ng/µl. La curva es realizada automáticamente por el equipo.

Procedimiento

- Dejar que los reactivos del kit Invitrogen alcancen la temperatura ambiente (22-28°C). Las fluctuaciones de temperatura pueden influir en precisión del ensayo y, por lo tanto, no sostenga los tubos del ensayo que contiene la solución con la mano calienta, pueden dan resultados más bajos.

- Conectar el regulador al tomacorriente y presione el botón de encendido. No exponer el equipo Fluorómetro Qubit directamente a la luz solar.
- Preparar una solución stock de trabajo, mezclando el buffer Quant-iT con el reactivo Quant-iT en las proporciones indicadas, Tabla D-1, Figura D-1.
- Se prepara una solución stock de trabajo según el número de muestras a analizar y los tres estándares, calculando 199 µl de buffer Qubit + 1 µl de reactivo de Qubit, por cada muestra. Por ejemplo, para 7 muestras y los tres estándares (10 tubos), son aproximadamente 200 µl por tubo y son 10 tubos, serían 2 ml de solución de trabajo (10 µl de reactivo de Qubit más 1990 µl de buffer Qubit). El procedimiento se ilustra en la Figura D-1.
- Alistar los tubos del ensayo como se describe en la tabla D-1.

Tabla D-1: Ensayo de Qubit para la determinación de proteínas.

Mirar el procedimiento de la figura D-1.

	Estándares	Muestras
Volumen de solución de trabajo	190 µL	180-199 µL
Volumen de los estándares	10 µL	-
Volumen de muestra	-	20 µL o 1 µL
Volumen total en cada tubo	200 µL	200 µL
Volumen total	200 µL	180 µL +20 µL=200 µL 199 µL+1 µL= 200 µL

- Mezclar las muestras o los estándares con la solución de trabajo por 2-3 segundos e incube los tubos a temperatura ambiente por 15 minutos.
- Calibrar el Fluorométro Qubit 2.0 usando los estándares. Si ha realizado una calibración anterior el Fluorométro Qubit 2.0 le pedirá que entre a leer nuevos estándares o usar el anterior.
- Si escoge leer nuevos estándares, presione Yes, inserte el tubo del estándar 1 en la cámara de lectura y presione Read, luego el 2, presione Read y por último el 3 y presione Read. La lectura dada por el estándar 3 debe ser más alta que el estándar 2, y la lectura de la muestra no debe ser superior al 50% de la lectura del estándar 3. En la pantalla aparece automáticamente la gráfica con los puntos de los datos.
- Inserta el tubo de muestra y presione Read, el resultado saldrá en la pantalla. Para leer las otras muestras, inserte el tubo en la cámara del equipo y presione Read

Next Sample. Los valores de las muestras deben estar dentro de los valores de los estándares. La medición toma aproximadamente 3 segundos. Este valor corresponde a la concentración después de diluir la muestra.

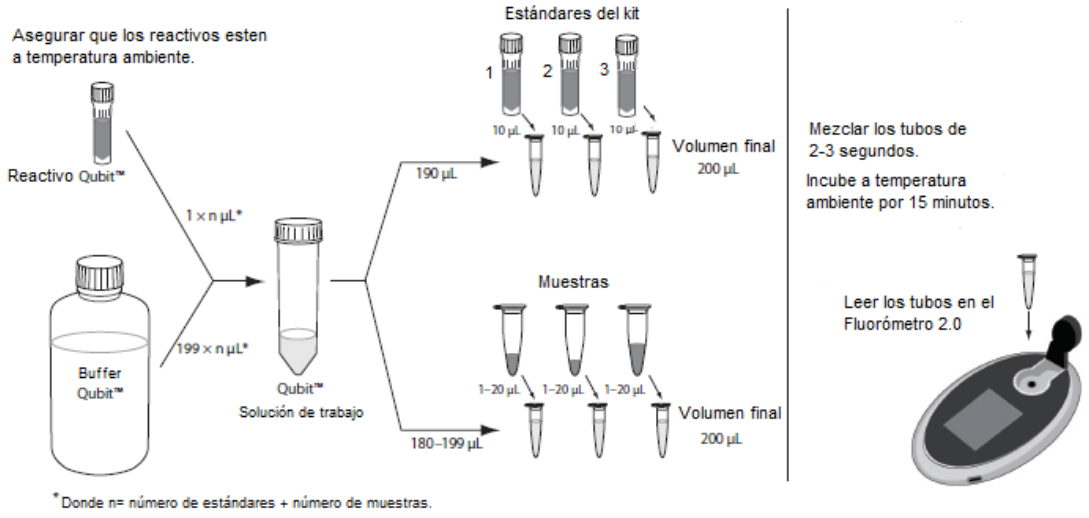
- Para calcular la concentración de la muestra original presione, Calculate stock Conc y escoja el volumen de muestra agregada al buffer (10 µl o 20 µl), moviendo la rueda digital. El Fluorómetro calcula automáticamente la concentración de la muestra original en µg/m utilizando la ecuación (D.1).

$$\text{Concentración} = \text{valor de QF} * \frac{200}{\text{X}}$$ (D.1).(Life Technology, 2015).

QF= el valor dado por el equipo

X= el volumen en microlitros empleado en el ensayo (10 ó 20 µl)

Figura D-1: Esquema del ensayo para proteínas usando la metodología con el kit de Qubit (Invitrogen., 2010).



Anexo E: Determinación de la actividad del ultrafiltrado

El extracto enzimático crudo obtenido en el numeral 2.4, con actividad hidrolítica de 4,8 U/ml y una actividad de transferencia de 4,3 U/ml (Anexo A), fue ultrafiltrado en los tubos Amicon Ultra 50 K con un punto de corte de 50.000 MWCO y se realizó la actividad enzimática, dando 2.5 U/ml, 2.6 U/ml y 2.8 U/ml. Una solución de glucosa de 0.5 mg/ml se utilizó como control y se le realizó el ensayo de DNS y glucosa oxidasa. La dilución para la determinación de los azúcares reductores fue de 1:20 y para el ensayo de la glucosa fue de 1:40. Se puede observar el resultado de actividad hidrolítica de 2,5 U/ml en las siguientes tablas y gráfica. Para los cálculos del rendimiento de la inmovilización Tabla 3-2 y Tabla 3-3 se tomó el dato actividad hidrolítica del ultrafiltrado de 2.6 U/ml.

Tablas E-1: Datos de la actividad del ultrafiltrado No. 1.

Pendiente DNS-Kit: 0,227 (mg/ml)/min.
Actividad hidrolítica (30 minutos): 2,5 U/ml.

Ensayo DNS (540nm)		
t (min)	**Abs.**	**Conc. (mg/ml)**
0	0,32	13,72
5	0,31	13,23
10	0,36	15,23
15	0,39	16,57
20	0,44	18,53
30	0,46	18,97
40	0,50	20,75

Kit de Glucosa (510nm)		
t (min)	**Abs**	**Conc. (mg/ml)**
0	0,57	6,63
5	0,54	6,29
10	0,50	5,84
15	0,53	6,16
20	0,55	6,39
30	0,51	5,91
40	0,49	5,74

t (min)	DNS-KIT
0	7,09
5	6,94
10	9,39
15	10,41
20	12,15
30	13,06
40	15,01

Tablas E-2: Datos de actividad del ultrafiltrado No. 2.

Pendiente DNS-Kit: 0,2363 (mg/ml)/min.
Actividad hidrolítica (30 minutos): 2,6 U/ml.

Ensayo DNS (540nm)			Kit de Glucosa (510nm)				
t (min)	**Abs.**	**Conc. (mg/ml)**	**t (min)**	**Abs**	**Conc. (mg/ml)**	**t (min)**	**DNS-KIT**
0	0,28	12,20	0	0,56	6,59	0	5,61
5	0,30	12,99	5	0,54	6,29	5	6,70
10	0,34	14,22	10	0,54	6,28	10	7,94
15	0,37	15,47	15	0,51	5,95	15	9,52
20	0,39	16,20	20	0,50	5,88	20	10,32
30	0,48	18,00	30	0,46	5,39	30	12,61
40	0,52	19,82	40	0,47	5,47	40	14,35

Tablas E-3: Datos de actividad del ultrafiltrado No. 3.

Pendiente DNS-Kit: 0,2511 (mg/ml)/min.
Actividad hidrolítica (30 minutos): 2,8 U/ml.

Ensayo DNS (540nm)			Kit de Glucosa (510nm)				
t (min)	**Abs.**	**Conc. (mg/ml)**	**t (min)**	**Abs**	**Conc. (mg/ml)**	**t (min)**	**DNS-KIT**
0	0,32	13,7	0	0,50	5,90	0	7,82
5	0,31	13,2	5	0,52	6,05	5	7,18
10	0,33	14,1	10	0,49	5,71	10	8,35
15	0,39	16,4	15	0,51	5,99	15	10,38
20	0,44	18,5	20	0,54	6,36	20	12,17
30	0,49	20,3	30	0,51	5,94	30	14,40
40	0,50	20,9	40	0,49	5,67	40	15,22

Anexo F: Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Es el método más ampliamente utilizado para el análisis cuantitativo de una mezcla de proteínas que permite monitorear la purificación y determinar la masa molecular aproximada de una proteína.

Fundamento

La separación de las proteínas se hace por migración electroforética a través de un gel de poliacrilamida que se forma por la polimerización de monómeros de acrilamida que se entrecruzan con la bisacrilamida. La concentración de acrilamida está relacionada con el tamaño de los poros, entre más concentración menor es el poro.

En el SDS-PAGE (electroforesis de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico), la proteína tiene una carga negativa debido a la interacción con el SDS. Antes de colocar la muestra en los pozos correspondientes, las proteínas son desnaturalizadas y disociadas al ser hervidas en SDS. Luego se aplica una corriente a través del gel y la proteína migra hacia el ánodo (electrodo positivo). La movilidad de la proteína está relativamente determinada por la porosidad del gel, las proteínas de masa molecular pequeño migran más rápido que las de peso molecular grande. Es importante la selección adecuada de concentración de acrilamida para una óptima separación de la proteína de interés (Daniel and Stuart, 1993; Walker, 2002).

Equipos

- Cámara de electroforesis vertical marca Biorad, Mini Protean
- Fuente de poder, Power Station 300

- Baño seco, temperatura de 100 °C
- Tubos eppendorf y Centrifuga
- Vortex

Reactivos

- Acrilamida, grado para electroforesis.
- Bis- acrilamida (NN`- metilenobisacrilamida).
- Sodio dodecil sulfato (SDS).
- Tris (2-hidroximetil-2-metil-1,3 propanodiol.
- Persulfato de amonio (PSA).
- TEMED (N, N, N´, N´- tetrametileno-etilenodiamina.
- 2-mercaptoetanol.
- Glicina.
- Glicerol.
- Ácido Clorhidrico (HCL).
- Azul de bromofenol.

a. Soluciones de trabajo

Solución de poliacrilamida, solución A (100ml)

- Acrilamida 29,2 g
- Bis- acrilamida 0,8 g

Disolver en 70 ml de agua destilada desionizada y completar a 100 ml. Filtrar por membrana de 0,45 µm. Almacenar en frasco ámbar a 4 °C.

Precaución: La acrilamida es extremadamente tóxica, causa parálisis en el sistema nervioso central. Puede ser absorbida por la piel. Usar guantes.

Solución B (Buffer para gel de separación 4X), 100ml

- Tris-HCL 2 M (pH 8,8) 75 ml 1,5 M
- SDS 10% 4 ml 0,4 %
- Agua. 21 ml

Estable, por meses refrigerado.

Solución C (Buffer para gel de concentración 4X), 100 ml

- Tris-HCL 1M (pH 6,8) 50 ml 0,5 M
- SDS 10% 4 ml 0,4 %
- Agua 46 ml

Estable, meses en refrigeración.

Persulfato de amonio 10%, 5

- Persulfato de amonio 0,5 g
- Agua 5ml

Estable, meses en refrigeración.

Buffer de corrida (1litro)

- Tris 3 g 25 mM
- Glicina 14,4 g 192 mM
- SDS 1g 0,1%
- Agua destilada para 1 litro.

El pH debe ser aproximadamente de 8,3. Estable a temperatura ambiente.

Buffer de muestra (carga) 5X, 10 ml

- Tris-HCL 1M (pH 6,8) 0,6ml
- Glicerol 50% 5 ml
- SDS 10% 2 ml
- 2-mercaptoetanol 0,5 ml
- Azul de bromofenol 1%, 1 ml
- Agua 0,9 ml

Estable, meses a -20 °C.

Solución de desteñido

- Metanol 100 ml

- Ácido acético glacial 100 ml
- Agua HPLC 500 ml

Preparación de los geles

Gel de separación (resolving) (7,5%)

- Agua destilada estéril 5 ml
- Solución B 2,5 ml
- Solución A 2,5 ml
- Persulfato de amonio al 10% 50 µl
- TEMED 5 µl

Gel concentración (4%)

- Agua destilada 2,77 ml
- Solución C 0,67 ml
- Solución A 0,53 ml
- Persulfato de amonio 10% 30 µl
- TEMED 5 µl

Solución tinción de Coomassie

- Azul de coomassie R-250, 1 g
- Metanol 450 ml
- Agua 450 ml
- Ácido acético glacial 100 ml

La cámara de electroforesis de Biorad tiene unos vidrios con dimensiones de 10 x 7 cm y un grosor de 0,75 mm para el gel.

Procedimiento

- Unir el vidrio separador con el vidrio superior delgado y ubicarlo en el soporte de los cristales. Fijar dejando un espacio entre ambos vidrios de 0,75mm. Colocar en el soporte para los geles y verificar que no tenga fuga.

- Preparar el gel de separación al 7,5% como se indicó. Agregar en un frasco vial, agua destilada estéril, solución B, solución A, persulfato de amonio al 10% y el reactivo de TEMED para completar la polimerización. Mezclar para homogenizar.
- Adicionar el gel en el espacio entre los cristales ocupando una tercera parte del volumen total.
- Adicionar agua estéril, evitando el contacto de la mezcla con el aire y favoreciendo su polimerización. Dejar entre 30-60 minutos.
- Observar en el frasco vial donde se preparó la mezcla, si polimerizo completamente.
- Retiramos el agua de los vidrios que aisló el gel de las condiciones oxidativas del aire y observamos el nivel superior, en que quedo el gel separador.
- Preparamos el gel de concentración de la misma forma que el gel separador. Hacer la mezcla de agua destilada estéril, solución C, solución A, persulfato de amonio al 10% y el TEMED. Mezclar y homogenizar.
- Agregar el gel de concentración encima del gel separador y colocamos el peine que da forma a los pozos, donde se agregan las muestras. Dejamos unos 30 minutos
- Sacamos los vidrios de los soportes para geles y se ubican en el soporte de la cubeta que tiene los electrodos que permite suministrar corriente al sistema. Colocamos el soporte dentro de la cubeta de electroforesis y se agrega el tampón en cantidad suficiente que cubra el gel. Se retira el peine con cuidado.
- En un eppendorf nuevo y estéril colocar 15 µl de muestra y 5 µl de buffer de carga. El control positivo, albúmina sérica bovina (BSA), se mezcló 4 µl de la albúmina y 5 µl de buffer de carga. Colocar en el baño seco 10 minutos a 100 °C. El buffer de carga contiene glicerol que permite aumentar la densidad de la muestra, depositándose en el fondo del pozo. El azul de bromofenol que nos permite visualizar las muestras durante la electroforesis.
- Centrifugo a 14.000 r.p.m por un minuto.
- Cargar en los pozos 4 µl del marcador de peso molecular Opti-Protein XL. Agregar en los otros pozos 4 µl de mezcla buffer de carga- albúmina sérica bovina y 15 µl de la mezcla muestra-buffer de carga.
- Conectamos lo electrodos a la fuente de poder, seleccionamos el voltaje inicial de 100 Voltios e iniciamos la electroforesis. Las proteínas están cargadas

negativamente por el SDS y migran de la parte superior al inferior del gel, separándose por el tamaño molecular.

- Apagamos la fuente de poder, sacamos el tampón y retiramos los geles del soporte de fijación de la cubeta de electroforesis. Lavamos los vidrios con el gel con abundante agua para retirar restos del tampón que pueden interferir con la coloración.
- Separamos los dos vidrios, retiramos el gel y lavamos con agua destilada para retirar el resto del tampón.
- Sacamos con mucho cuidado el gel y lo colocamos en un recipiente que contiene azul de coomassie 0,1% (p/v). Dejamos en agitación orbital muy suave en un Thermo Scientific Max Q 4000 por 50 minutos o hasta visualizar las proteínas.
- Retiramos la solución colorante. Lavamos varias veces con agua destilada para quitar la solución de tinción que no se fijó.
- Desteñir varias veces con la solución de agua, metanol y ácido acético glacial, dejándola en agitación suave. La solución de desteñido retira el colorante que no se unió específicamente a las proteínas y permite visualizar las bandas. La migración de las proteínas en el gel es inversamente proporcional a su tamaño, menor tamaño, mayor migración. Las bandas se visualizaron en un equipo digitador Biorad Molecular Image.

Anexo G: Inmovilización en Sephadex G-100 y Eupergit CM

La enzima del extracto enzimático ultrafiltrado fue inmovilizada por adsorción en Sephadex G-100, 1gramo en 30 ml y 3 gramos en 30 ml, dando respectivamente una actividad hidrolítica de 0,051 U/ml y 0,076 U/ml.

El extracto enzimático ultrafiltrado se inmovilizó en el Eupergit CM empleando 0,1 gramo en 30 ml y 0,5 gramos en 30 ml, dando una actividad hidrolítica de 0,052 y 0,054 respectivamente. Los datos son los siguientes.

Tablas G-1: Resultado de inmovilización en SephadexG-100 (1g para 30 ml).

Pendiente DNS -KIT: 0,0046 (mg/ml)/min.
Actividad hidrolítica: 0,051U/ml

Ensayo DNS (540nm)		
t (min)	Abs.	Conc. (mg/ml)
0	0,0183	0,355
5	0,0267	0,441
10	0,0320	0,496
15	0,0357	0,534
20	0,0353	0,530
30	0,0287	0,461
40	0,0207	0,379

Kit de Glucosa (510nm)		
t (min)	Abs	Conc. (mg/ml)
0	0,077	0,114
5	0,130	0,154
10	0,130	0,193
15	0,147	0,218
20	0,127	0,188
30	0,177	0,263
40	0,140	0,208

t (min)	DNS-KIT
0	0,241
5	0,287
10	0,302
15	0,315
20	0,342
30	0,199
40	0,170

Tablas G-2: Resultado de inmovilización en SephadexG-100 (3g para 30 ml).

Pendiente DNS-Kit: 0,0068 (mg/ml)/min.
Actividad hidrolítica: 0,076 U/ml

Ensayo DNS (540nm)			Kit de Glucosa (510nm)				
t (min)	Abs.	Conc. (mg/ml)	t (min)	Abs	Conc. (mg/ml)	t (min)	DNS-KIT
0	0,0380	0,558	0	0,254	0,378	0	0,18
5	0,0380	0,558	5	0,251	0,374	5	0,18
10	0,0410	0,589	10	0,235	0,350	10	0,24
15	0,0460	0,640	15	0,261	0,388	15	0,25
20	0,0517	0,699	20	0,259	0,385	20	0,31
30	0,0467	0,647	30	0,376	0,560	30	0,09
40	0,0517	0,699	40	0,258	0,384	40	0,32

Tablas G-3: Resultado de inmovilización en Eupergit CM (0,1g para 30 ml).

Pendiente DNS-Kit: 0,0047 (mg/ml)/min.
Actividad hidrolítica: 0,052 U/ml.

Ensayo DNS (540nm)			Kit de Glucosa (510nm)				
t (min)	Abs.	Conc. (mg/ml)	t (min)	Abs	Conc. (mg/ml)	t (min)	DNS-KIT
0	0,0343	0,231	0	0,0643	0,038	0	0,19
5	0,0420	0,261	5	0,0833	0,050	5	0,21
10	0,0490	0,289	10	0,1060	0,063	10	0,23
15	0,0587	0,327	15	0,1123	0,067	15	0,26
20	0,0670	0,360	20	0,1233	0,073	20	0,29
30	0,0640	0,349	30	0,1630	0,097	30	0,25
40	0,0803	0,413	40	0,5133	0,306	40	0,11

Tablas G-4: Resultado de inmovilización en Eupergit CM (0,5g para 30 ml).

Pendiente: DNS-KIT: 0,0049 (mg/ml)/min.
Actividad hidrolítica: 0,054 U/ml.

Ensayo DNS (540nm)		
t (min)	**Abs.**	**Conc. (mg/ml)**
0	0,0072	0,239
5	0,0150	0,320
10	0,0173	0,344
15	0,0237	0,410
20	0,0290	0,465
30	0,0393	0,572
40	0,0380	0,558

Kit de Glucosa (510nm)		
t (min)	**Abs**	**Conc. (mg/ml)**
0	0,0353	0,053
5	0,0640	0,095
10	0,0800	0,119
15	0,1057	0,157
20	0,1240	0,185
30	0,1550	0,231
40	0,1847	0,275

t (min)	DNS-KIT
0	0,19
5	0,23
10	0,23
15	0,25
20	0,28
30	0,34
40	0,28

Anexo H: Secuencia consenso

Resultados de la secuencia consenso utilizando el programa BioEdit Sequence Alignment.

>Contig-0

GCGGTTCGGGCCGTGCCTTATACATGCAAGTCGAACGCACAGCGAAAGGTGCTTGCACCT
TTCAAGTGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGACAACCTGCCTCAAGGCTGGGGATA
ACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGAATAAAACTTAGTGTCGCATGACAAAAAGTTAAA
AGGCGCTTCGGCGTCACCTAGAGATGGATCCGCGGTGCATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAA
GGCCTACCAAGACAATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTG
AGACACCGGCCCTCAAAACTCCTACCGGAAGGCTGGCAGTTAGGGAATCTTCCACAATGG
GCGGAAAGCCTTGATGAAGCAATCGCCGCGTGTGTTGATGAAGGCCTTCCGGTCGTAAAG
CACTGTTGTATGGGAAGAACAGCTAGAATAAGAAATGATTTTAGTTTGACGGTACCATAC
CAGAAAGGGACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGTCCCGAGCGTAT
CCGGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGGTTTATTAAGTCTGATGTGAAAGCC
CGGAGCTCAACTCCCGGAATGGCATTGGAAACTGGTTAACTTGAGTGCAGTAGAGGTAAG
TGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGG
CGGCTTACTGGACTGCAACTGACGTTGAGGCTCGAAAGTGTGGGTAGCAAACAGGATTAG
ATACCCTGGTAGTCCACACCGTAAACGATGAACACTAGGTGTTAGGAGGTTTCCGCCTCT
TAGTGCCGAAGCTAACGCATTAAGTGTTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAAC
TCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAAC
GCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGAAGCTTTTAGAGATAGAAGTGTTCTCT
TCGGAGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTCGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGG
TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCAGCATTCAGATGGGCACTCT
AGCGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGCGGGGACGACGTCAGATCATCATGCCCC
TTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTATACAACGAGTTGCCAACCCGCGAG
GGTGAGCTAATCTCTTAAAGTACGTCTCAGTTCGGATTGTAGTCTGCAACTCGACTACAT
GAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCT
TGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTTGTAATGCCCAAAGCCGGTGGCCTAACCT
TTTAGGAAGGAGCCGTCTAAGGCAGAACAGTGC

La secuencia consenso arrojó una identidad del 98,48% y una longitud de alineamiento de 1460 bases.

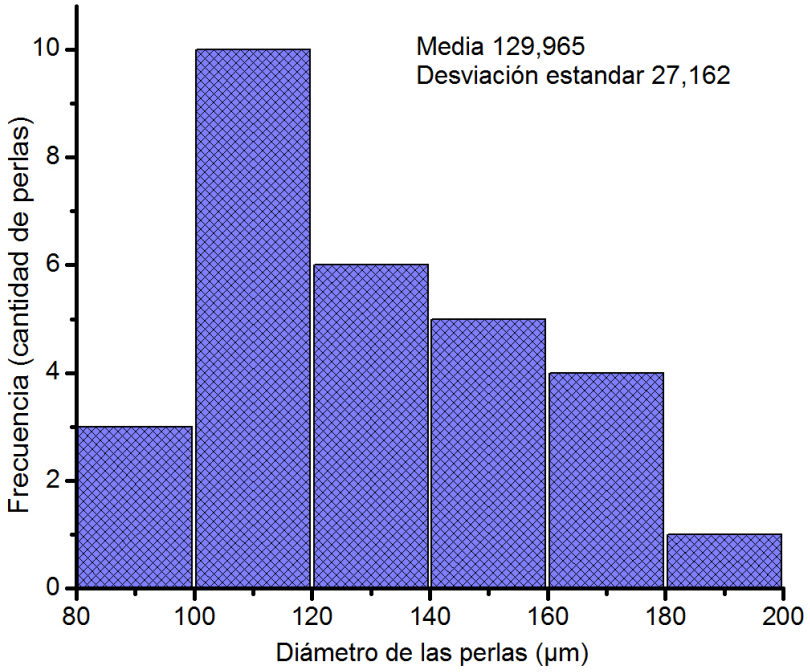
Anexo I: Diámetro de las partículas del Sephadex G-100

Utilizando la microscopia electrónica de barrido se tomó micrografías de la superficie de las partículas del biocatalizador Sephadex G-100 con un voltaje de acelerador de 15.0 Kv y un tamaño de imagen de 200 µm, para determinar el diámetro de las perlas. Se utilizó el programa Origin 8, para medir el diámetro aproximado de las perlas, dando 115 µm, con una desviación de 0,098.

Tabla I-1: Diámetro del inmovilizado en la micrografía de SEM.

Dato	Diámetro (µm)	Dato	Diámetro (µm)
1	90	16	135
2	94	17	137
3	94	18	137
4	102	19	137
5	103	20	140
6	103	21	142
7	105	22	146
8	105	23	151
9	109	24	159
10	111	25	161
11	113	26	162
12	118	27	170
13	118	28	174
14	126	29	194
15	133	-	-

Figura I-1: Distribución por tamaño del inmovilizado.



Diámetro de las perlas de 100-120 µm (10 perlas), 120-140 µm (6 perlas), 140-160 µm (5 perlas).

Bibliografía

Agyei, D., Shanbhag, B. K., & He, L. (2015). [11] Enzyme engineering (immobilization) for food applications. In Improving and Tailoring Enzymes for Food Quality and Functionality (pp. 213-235). Woodhead Publishing. Doi: 10.1016/B978-1-78242-285-3.00011-9.

Ahmad, R., & Sardar, M. (2015). Enzyme immobilization: an overview on nanoparticles as immobilization matrix. Biochemistry and Analytical Biochemistry, 4(2), 1-8. Doi: 10.4172/2161-1009.1000178.

Ahmed, Z., & Ahmad, A. (2017). [8] Biopolymer Produced by the Lactic Acid Bacteria: Production and Practical Application. In Microbial Production of Food Ingredients and Additives (pp. 217-257). Academic Press. Doi: 10.1016/B978-0-12-811520-6.00008-8.

Alcalde, M., Plou, F. J., De Segura, A. G., Remaud-Simeon, M., Willemot, R. M., Monsan, P., & Ballesteros, A. (1999). Immobilization of native and dextran-free dextransucrases from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F for the synthesis of glucooligosaccharides. Biotechnology techniques, 13(11), 749-755.
Doi: 10.1023/A:1008966213425.

Al-doori A. S. Aboud, a. H. Sedrah, Z, T. (2015). Optimization and characterization of dextransucrase production by local *Leuconostoc mesenteroides*. International Journal of Scientific Engineering and Applied Science,1 (6), 476-483.

Alsop R. M. (1983). Industrial production of dextrans. In Bushell (Ed.), Prog. Industrial Biotechnology (pp. 1–42). Elseiver.

Aman, A., Siddiqui, N. N., & Qader, S. A. U. (2012). Characterization and potential applications of high molecular weight dextran produced by *Leuconostoc mesenteroides* AA1. Carbohydrate polymers, 87(1), 910-915. Doi: 10.1016/j.carbpol.2011.08.094.

Ansari, S. A., & Husain, Q. (2012). Lactose hydrolysis from milk/whey in batch and continuous processes by concanavalin A-Celite 545 immobilized *Aspergillus oryzae* β galactosidase. Food and Bioproducts processing, 90(2), 351-359. Doi: 10.1016/j.fbp.2011.07.003.

Argüello-Morales, M., Sánchez-González, M., Canedo, M., Quirasco, M., Farrés, A., & López-Munguía, A. (2005). Proteolytic modification of *Leuconostoc mesenteroides* B-512F dextransucrase. Antonie van Leeuwenhoek, 87(2), 131-141. Doi: 10.1007/s10482-004-2042-4.

Aslan, Y., Handayani, N., Stavila, E., & Loos, K. (2014). Covalent immobilization of *Pseudomonas fluorescens* lipase onto Eupergit CM. Int. J. Curr. Res, 6(2), 5225-5228.

Bhavani, A. L., & Nisha, J. (2010). Dextran—the polysaccharide with versatile uses. Int J PharmBiol Sci, 1(4), 569-573.

Baines, D. (2001). Analysis of purity. Protein purification techniques. Oxford University Press New York. 27-49.

Baker, R. W. (2004). [6] Ultrafiltration. In Membrane technology and applications Functionality (pp. 240-241). John Wiley & Sons.

Barbosa, O., Ortiz, C., Berenguer-Murcia, A., Torres, R., Rodrigues, R. C., & Fernandez-Lafuente, R. (2015). Strategies for the one-step immobilization–purification of enzymes as industrial biocatalysts. Biotechnology Advances, 33(5), 435-456. Doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.03.006.

Baruah, R., Das, D., & Goyal, A. (2016). Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria: current trends and applications. J Prob Health, 4(141), 2. Doi: 10.4172/2329-8901.1000141.

Berensmeier, S., Ergezinger, M., Bohnet, M., & Buchholz, K. (2004). Design of immobilised dextransucrase for fluidised bed application. Journal of biotechnology, 114(3), 255-267. Doi: 10.1016/j.jbiotec.2004.04.009.

Betancor, L., López-Gallego, F., Alonso-Morales, N., Dellamora, G., Mateo, C., Fernandez-Lafuente, R., & Guisan, J. M. (2006). Glutaraldehyde in protein immobilization. In Immobilization of enzymes and cells (pp. 57-64). Humana Press.

Bilal, M., & Iqbal, H. M. (2019). Naturally-derived biopolymers: Potential platforms for enzyme immobilization. International journal of biological macromolecules.130, 462-482. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.02.152.

Bisswanger, H. (2011). [3] Practical enzymology (pp. 248-249). Weinheim, Germany. Wiley-Blackwell.

Boller, T., Meier, C., & Menzler, S. (2002). EUPERGIT oxirane acrylic beads: how to make enzymes fit for biocatalysis. Organic Process Research & Development, 6(4), 509-519. Doi: 10.1021/op015506w.

Brady, D., & Jordaan, J. (2009). Advances in enzyme immobilisation. Biotechnology letters, 31(11), 1639-1650. Doi: 10.1007/s10529-009-0076-4.

Brena, B., González-Pombo, P., & Batista-Viera, F. (2013). [2] Immobilization of enzymes: a literature survey. In Immobilization of enzymes and cells (pp. 15-31). Humana Press, Totowa, NJ.

Buchholz, K., & Monsan, P. (2003). [47] Dextransucrase. In Handbook of Food Enzymology, JR Whitaker, AGJ Voragen, DWS Wong. M.

Buitrago Hurtado, G., Villamil Porras, W. A., Vargas Sepúlveda, D. J., Otálvaro Alvarez, A., & Flórez, G. Y. (2013). Evaluating the effect of the number of generations in IBUN 91.2. 98 *Leuconostoc mesenteroides* cultures on enzyme extract production. Ingeniería e Investigación, 33(1), 66-70.

Cao, L. (2006). Adsorption based immobilization. In Carrier bound immobilization Enzymes (53-168). Netherlands: John Wiley & Sons.

Chen, J., Zhang, J., Han, B., Li, Z., Li, J., & Feng, X. (2006). Synthesis of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) in CO2-expanded micellar solutions. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 48(1), 72-76. Doi: 10.1016/j.colsurfb.2006.01.010.

Chibata, I., Tosa, T., Sato, T., & Mori, T. (1976). [51] Production of l-amino acids by aminoacylase adsorbed on DEAE-sephadex. In Methods in enzymology (Vol. 44, pp. 746-759). Academic Press.

Corbatón Báguena, M. J. (2015). Limpieza de membranas de ultrafiltración aplicadas en la industria alimentaria por medio de técnicas no convencionales y caracterización del ensuciamiento de las membranas (Tesis doctoral). Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España.

Daniel, M. B., Stuart, J. E. (1993). [5] Gel electrophoresis under nondenaturing conditions. In Protein methods, (pp95-115). Wiley, New York.

Datta, S., Christena, L. R., & Rajaram, Y. R. S. (2013). Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. 3 Biotech, 3(1), 1-9.
Doi: 10.1007/s13205-012-0071-7.

David, A. E., Yang, A. J., & Wang, N. S. (2011). [6] Enzyme stabilization and immobilization by sol-gel entrapment. In Enzyme Stabilization and Immobilization (pp. 49-66). Humana Press, Totowa, NJ.

Del moral, S. T. (2004). Degradación proteolítica de la dextransacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL 512F. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca, México.

DiCosimo, R., McAuliffe, J., Poulose, A. J., & Bohlmann, G. (2013). Industrial use of immobilized enzymes. Chemical Society Reviews, 42(15). Doi: 6437-6474. 10.1039/c3cs35506c.

Dols, M., Chraibi, W., Remaud-Simeon, M., Lindley, N. D., & Monsan, P. F. (1997). Growth and energetics of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 during metabolism of various sugars and their consequences for dextransucrase production. Appl. Environ. Microbiol, 63(6), 2159-2165.

Dols, M., Remaud-Simeon, M., & Monsan, P. F. (1997). Dextransucrase production by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299. Comparison with *L. mesenteroides* NRRL B-512F. Enzyme and microbial technology, 20(7), 523-530. Doi: 10.1016/S0141-0229(96)00189-5.

El-Mansi, E. M. T., Bryce, C. F., Hartley, B. S., & Demain, A. L. (2012). [1] Fermentation microbiology and biotechnology: an historical perspective. In Fermentation Microbiology and Biotechnology. 2nd ed. London, UK: Taylor & Francis, pp. 1-9.

Escobar, M, Nancy, Paola. (2012). Evaluación Del Comportamiento De La Fibra Soluble Como Compuesto Bioactivo, Adicionada En Productos Horneados De Panadería Y Bizcochería (Tesis de Maestría). Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.

Evans, D. R., Romero, J. K., & Westoby, M. (2009). [9] Concentration of proteins and removal of solutes. In Methods in enzymology, (Vol. 463, pp. 97-120). Academic Press.

Fernandes, P. (2010). Enzymes in food processing: a condensed overview on strategies for better biocatalysts. Enzyme research. Doi: 10.4061/2010/862537.

Flórez, G. Glaehter. Yhon. (2014). Estudio de la enzima dextransacarasa (DS) producida por *Leuconostoc mesenteroides* cepa IBUN 91.2. 98 (Tesis Doctoral). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

Flórez, G. Glaehter. Yhon. Hurtado, G. B., & Ospina, S. A. (2018). New dextransucrase purification process of the enzyme produced by *Leuconostoc mesenteroides* IBUN 91.2. 98 based on binding product and dextranase hydrolysis. Journal of biotechnology, 265, 8-14.

Fonseca, F. (2006). Cryopreservation of lactic acid bacteria: effect of linear cooling rates. Cryobiology, *53*, 395-396. Doi: 10.1016/j.cryobiol.2006.10.067.

Funane, K., Yamada, M., Shiraiwa, M., Takahara, H., Yamamoto, N., Ichishima, E., & Kobayashi, M. (1995). Aggregated form of dextransucrases from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F and its constitutive mutant. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 59(5), 776-780. Doi: 10.1080/bbb.59.776.

Garcia-Galan, C., Berenguer-Murcia, Á., Fernandez-Lafuente, R., & Rodrigues, R. C. (2011). Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance. Advanced Synthesis & Catalysis, 353(16), 2885-2904. Doi: 10.1002/adsc.201100534.

Garibay, M. G., Ramírez, R. Q., & López-Munguía, A. (Eds.). (2004). Biotecnología alimentaria. Limusa. México.

Garriga, M., Almaraz, M., & Marchiaro, A. (2017). Determination of reducing sugars in extracts of *Undaria pinnatifida* (harvey) algae by UV-visible spectrophotometry (DNS method). Actas de Ingeniería, 3, 173-179.

Gaudreau, H., Champagne, C. P., Conway, J., & Degré, R. (1999). Effect of ultrafiltration of yeast extracts on their ability to promote lactic acid bacteria growth. Canadian journal of microbiology, 45(11), 891-897. Doi: 10.1139/w99-089.

Ge, S. J., & Zhang, L. X. (1993). Predigestion of soybean proteins with immobilized trypsin for infant formula. Applied biochemistry and biotechnology, 43(3), 199-209.

Gea, S. J., Bai, H., Yuan, H. S., & Zhang, L. X. (1996). Continuous production of high degree casein hydrolysates by immobilized proteases in column reactor. Journal of biotechnology, 50, 161-170. Doi: 10.1016/0168-1656(96)01561-1.

Gómez de Segura, A., Alcalde, M., J. Plou, F., Remaud-simeon, M., Monsan, P., & Ballesteros, A. (2003). Encapsulation in LentiKats of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299, and its effect on product selectivity. Biocatalysis and Biotransformation, 21(6), 325-331.
Doi: 10.1080/10242420310001630191.

Gómez de Segura, A., Alcalde, M., Yates, M., Rojas-Cervantes, M. L., López-Cortés, N., Ballesteros, A., & Plou, F. J. (2004). Immobilization of Dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F on Eupergit C Supports. Biotechnology progress, 20(5), 1414-1420. Doi: 10.1021/bp0400083.

Gonzáles de Buitrago J. M. (2010). [14] Cromatografía. En Técnicas y Métodos de Laboratorio Clínico (pp. 191-210). Barcelona: Elsevier.

Goto, M., Hatanaka, C., & Goto, M. (2005). Immobilization of surfactant–lipase complexes and their high heat resistance in organic media. Biochemical engineering journal, 24(1), 91-94. Doi: 10.1016/j.bej.2005.01.027.

Goyal, A., & Katiyar, S. S. (1997). Effect of certain nutrients on the production of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. Journal of basic microbiology, 37(3), 197-204. Doi: 10.1002/jobm.3620370308.

Goyal, A., & Katiyar, S. S. (1998). Studies on the inactivation of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F dextransucrase by o-phthalaldehyde: evidence for the presence of an essential lysine residue at the active site. Journal of enzyme inhibition, 13(2), 147-160. Doi: 10.3109/14756369809035833.

Goyal, A., Nigam, M., & Katiyar, S. S. (1995). Optimal conditions for production of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRLL B-512F and its properties. Journal of basic microbiology, 35(6), 375-384. Doi: 10.1002/jobm.3620350604.

Groenwall, A. and Ingelman, B. (1948) 'Manufacture of infusion and injection fluids.' U.S.

Guerrand, D. (2018). [26] Economics of food and feed enzymes: Status and prospectives. In Enzymes in Human and Animal Nutrition (pp. 487-514). Academic Press.

Han, N. S., Kang, S. Y., Lee, S. B., & Robyt, J. F. (2005). Affinity immobilization of dextransucrase on dextran-based support and the production of leucrose. Food Science and Biotechnology, 14(3), 317-322.

Harju, M., Kallioinen, H., & Tossavainen, O. (2012). Lactose hydrolysis and other conversions in dairy products: Technological aspects. International Dairy Journal, 22(2), 104-109. Doi: 10.1016/j.idairyj.2011.09.011.

Holland, R. and Liu, S. (2011) 'Leuconostoc spp.', In Encyclopedia of Dairy Sciences. Elseiver. Doi: 10.1016/B978-0-08-100596-5.00859-3.

Homaei, A. A., Sariri, R., Vianello, F., & Stevanato, R. (2013). Enzyme immobilization: an update. Journal of chemical biology, 6(4), 185-205.
Doi: 10.1007/s12154-013-0102-9.

Invitrogen. (2010). Qubit Assays. Julio de 2019, de Life Technologies Corporation Sitio web: https://www.ieg.uu.se/digitalAssets/176/c_176882-l_3-k_qubitquickrefcard.pdf.

Jensen, V. J., & Rugh, S. (1987). [33] Industrial-scale production and application of immobilized glucose isomerase. In Methods in enzymology. (Vol. 136, pp. 356-370). Academic Press.

Jesionowski, T., Zdarta, J., & Krajewska, B. (2014). Enzyme immobilization by adsorption: A review. Adsorption, 20, 801-821.Doi: 10.1007/s10450-014-9623-y.

Ju, S. Y., Kim, J. H., & Lee, P. C. (2016). Long-term adaptive evolution of *Leuconostoc mesenteroides* for enhancement of lactic acid tolerance and production. Biotechnology for biofuels, 9, 1-12. Doi: 10.1186/s13068-016-0662-3.

Kawakita, H., Hamamoto, K., Seto, H., Ohto, K., Harada, H., & Inoue, K. (2009). Porosity estimation of a membrane filled with dextran produced by immobilized dextransucrase. AIChE journal, 55(1), 275-278.Doi: 10.1002/aic.11654.

Kim, D., & Robyt, J. F. (1994a). Production and selection of mutants of *Leuconostoc mesenteroides* constitutive for glucansucrases. Enzyme and microbial technology, 16, 659-664. Doi: 10.1016/0141-0229(94)90086-8.

Kim, D., & Robyt, J. F. (1994b). Properties of *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMC constitutive dextransucrase. Enzyme and microbial technology, 16(12), 1010-1015. Doi: 10.1016/0141-0229(94)90134-1.

Kobayashi, M., & Matsuda, K. (1976). Purification and properties of the extracellular dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299. The Journal of Biochemistry, 79(6), 1301-1308. Doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a131184.

Kobayashi, M., & Matsuda, K. (1980). Characterization of the multiple forms and main component of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology, *614*(1), 46-62. Doi: 10.1016/0005-2744(80)90166-7.

Kongo, JM. Malcata, FX. (2016). Acidophilus Milk. In Encyclopedia of food and health (pp. 6-14). Oxford: Elseiver.

Kothari, Damini. Das Deeplina, Patel Seema, Goyal Arun. (2015). [25] Dextran and Food Application. In Polysaccharides (pp. 735-748). Switzerland: Springer.

Kubik, C., Sikora, B., & Bielecki, S. (2004). Immobilization of dextransucrase and its use with soluble dextranase for glucooligosaccharides synthesis. Enzyme and microbial technology, 34, 555-560. Doi: 10.1016/j.enzmictec.2003.11.022.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227(5259), 680-685. Doi: 10.1038/227680a0.

Lamas, E. M., Barros, R. M., Balcão, V. M., & Malcata, F. X. (2001). Hydrolysis of whey proteins by proteases extracted from *Cynara cardunculus* and immobilized onto highly activated supports. Enzyme and Microbial Technology, 28(7-8), 642-652. Doi: 10.1016/S0141-0229(01)00308-8.

Lazić, M. L., Veljković, V. B., Vučetić, J. I., & Vrvić, M. M. (1993). Effect of pH and aeration on dextran production by *Leuconostoc mesenteroides*. Enzyme and microbial technology, 15, 334-338. Doi: 10.1016/0141-0229(93)90160-4.

Leroy, F., & De Vuyst, L. (2016). Advances in production and simplified methods for recovery and quantification of exopolysaccharides for applications in food and health. Journal of dairy science, 99(4), 3229-3238. Doi: 10.3168/jds.2015-9936.

Li, C., Zhang, G., Liu, N., & Liu, L. (2015). Preparation and Properties of *Rhizopus oryzae* Lipase Immobilized Using an Adsorption-Crosslinking Method. International journal of food properties, 19(8), 1776-1785. Doi: 10.1080/10942912.2015.1107732.

Life Technologies. (2015). Qubit® Protein Assay Kits. Julio 3 de 2019, de Thermofisher Sitio web: https://assets.thermofisher.com/TFS- Assets/LSG/manuals/Qubit_ Protein_ Assay_UG.pdf.

Lim, Y. P., & Mohammad, A. W. (2012). Influence of pH and ionic strength during food protein ultrafiltration: Elucidation of permeate flux behavior, fouling resistance, and mechanism. Separation Science and Technology, 47, 446-454. Doi: 10.1080/01496395.2011.627907.

Liu S-Q. (2016). Lactic Acid Bacteria: *Leuconostoc spp*. In Reference Module in Food Science (1-6). Melbourne: Elseiver.

Liu, A., Jia, Y., Zhao, L., Gao, Y., Liu, G., Chen, Y., ... & Chen, H. (2018). Diversity of isolated lactic acid bacteria in Ya'an sourdoughs and evaluation of their exopolysaccharide production characteristics. LWT, 95, 17-22. Doi: 10.1016/j.lwt.2018.04.061.

Liu, S. (2017). [7] Enzymes. In Bioprocess Engineering (pp. 297-373). New York: Elsevier.

Lopez, A., & Monsan, P. (1980). Dextran synthesis by immobilized dextran sucrase. Biochimie, 62(5-6), 323-329. Doi: 10.1016/s0300-9084(80)80161-1.

Lutz Herb. (2015). [1] Fundamentals EMD Millipore, Biomanufacturing Sciences Network. In Ultrafiltration for Bioprocessing (pp.1-205). Cambridge: Elseiver.

Lynch, K. M., Zannini, E., Coffey, A., & Arendt, E. K. (2018). Lactic acid bacteria exopolysaccharides in foods and beverages: isolation, properties, characterization, and health benefits. Annual Review of Food Science and Technology, 9, 155-176. Doi: 10.1146/annurev-food-030117-012537.

Mayo, B., Aleksandrzak-Piekarczyk, T., Fernández, M., Kowalczyk, M., Álvarez-Martín, P., & Bardowski, J. (2010). [1] Updates in the metabolism of lactic acid bacteria. In Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications, pp. 3-33.

Mellano, E. (2009). Es la proteólisis de la dextransacarasa (DsrS) de *Leuconostoc mesenteroides* B512F un proceso autocatalítico? (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca, México.

Michelena, G. L., Martínez, A., Bell, A., Carrera, E., & Valencia, R. (2003). Scale-up of dextransucrase production by *Leuconostoc mesenteroides* in fed batch fermentation. Brazilian Archives of Biology and Technology, 46(3), 455-459. Doi: 10.1590/S1516-89132003000300017.

Miljković, M. G., Davidović, S. Z., Kralj, S., Šiler-Marinković, S. S., Rajilić-Stojanović, M. D., & Dimitrijević-Branković, S. I. (2017). Characterization of dextransucrase from

Leuconostoc mesenteroides T3, water kefir grains isolate. HEMIJSKA INDUSTRIJA, 71(4), 351-360. Doi: 10.2298/HEMIND160421046M.

Miller, A. W., & Robyt, J. F. (1986). Functional molecular size and structure of dextransucrase by radiation inactivation and gel electrophoresis. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology, 870(2), 198-203. Doi: 10.1016/0167-4838(86)90222-0.

Miller, A. W., Eklund, S. H., & Robyt, J. F. (1986). Milligram to gram scale purification and characterization of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. Carbohydrate research, 147(1), 119-133. Doi: 10.1016/0008-6215(86)85011-x.

Moncayo, D. (2013). Desarrollo de un recubrimiento comestible a partir de un biopolímero para prolongar la vida útil de frutas frescas. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.

Monsan, P., Paul, F., Auriol, D., & Lopez, A. (1987). [23] Dextran synthesis using immobilized *Leuconostoc mesenteroides* dextransucrase. In Methods in enzymology (Vol. 136, pp. 239-254). Academic Press. Doi: 10.1016/S0076-6879(87)36025-2.

Murase, N., Uetake, Y., Sato, Y., Irie, K., Ueno, Y., Hirauchi, T., ... & Hirai, M. (2018). Frozen State of Sephadex® Gels of Different Crosslink Density Analyzed by X-ray Computed Tomography and X-ray Diffraction. Gels, 4(44), 1-12. Doi: 10.3390/gels4020044.

Naessens, M., Cerdobbel, A., Soetaert, W., & Vandamme, E. J. (2005). *Leuconostoc* dextransucrase and dextran: production, properties and applications. Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology, 80, 845-860. Doi: 10.1002/jctb.1322.

Nigam, M., Goyal, A., & Katiyar, S. S. (2006). High yield purification of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteriodes* NRRL B-512F by phase partitioning. Journal of food biochemistry, 30(1), 12-20. Doi: 10.1111/j.1745-4514.2005.00047.x.

North, M. Beynon, R. (2001). [9] Prevention of unwanted proteolysis. In Proteolytic Enzymes (pp. 211-232). New York: Oxford.

Novick, S. J., & Rozzell, J. D. (2005). [16] Immobilization of enzymes by covalent attachment. In Microbial enzymes and biotransformations (pp. 247-271). Humana Press.

Nunes, J. C., de Amorim, M. T. P., Escobar, I. C., Queiroz, J. A., & Morão, A. M. (2014). Plasmid DNA/RNA separation by ultrafiltration: Modeling and application study. Journal of membrane science, 463, 1-10. Doi: 10.1016/j.memsci.2014.03.036.

Ölçer, Z., & Tanriseven, A. (2010). Co-immobilization of dextransucrase and dextranase in alginate. Process Biochemistry, 45(10), 1645-1651. Doi: 10.1016/j.procbio.2010.06.011.

Ovsejevi, K., Manta, C., & Batista-Viera, F. (2013). [7] Reversible covalent immobilization of enzymes via disulfide bonds. In Immobilization of Enzymes and Cells (pp. 89-116). Humana Press, Totowa, NJ.

Paradossi, G., Cavalieri, F., Chiessi, E., Mondelli, C., & Telling, M. T. (2004). Structural fluctuations in cross-linked matrices with narrow pore size distribution. Chemical physics, 302(1-3), 143-148. Doi: 10.1016/j.chemphys.2004.04.004.

Parlak, M., Ustek, D., & Tanriseven, A. (2013). A novel method for covalent immobilization of dextransucrase. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 89, 52-60. Doi: 10.1016/j.molcatb.2012.12.013.

Patel, A. K., Singhania, R. R., & Pandey, A. (2017). [2] Production, purification, and application of microbial enzymes. In Biotechnology of Microbial Enzymes (pp. 13-41). Academic Press.

Polizzi, K. M., Bommarius, A. S., Broering, J. M., & Chaparro-Riggers, J. F. (2007). Stability of biocatalysts. Current opinion in chemical biology, 11(2), 220-225. Doi: 10.1016/j.cbpa.2007.01.685.

Polo, L. M. (2015). [1] Introducción a la cromatografía. En Fundamentos de cromatografía (pp. 19-30). Madrid: Dextra.

Popescu, A., & Doyle, R. J. (1996). The Gram stain after more than a century. Biotechnic & histochemistry, 71(3), 145-151. Doi: 10.3109/10520299609117151.

Preciado, G. F. (2003). Optimización de una superficie de respuesta utilizando JMP. Mosaicos Matemáticos, 11, 17-23.

Purama, R. K., & Goyal, A. (2007). Effect of nutrients by one variable at a time (OVAT) approach on the dextransucrase production from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-640. Internet J. Microbiol, 5(1),1-9.

Purama, R. K., & Goyal, A. (2008a). Identification, effective purification and functional characterization of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-640. Bioresource technology, 99, 3635-3642. Doi: 10.1016/j.biortech.2007.07.044.

Purama, R. K., & Goyal, A. (2008b). Screening and optimization of nutritional factors for higher dextransucrase production by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-640 using statistical approach. Bioresource technology, 99(15), 7108-7114. Doi: 10.1016/j.biortech.2008.01.032.

Purama, R. K., & Goyal, A. (2009). Optimization of conditions of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-640 for production of a dextransucrase and its assay. Journal of food biochemistry, 33(2), 218-231. Doi: 10.1111/j.1745-4514.2009.00219.x.

Ren, Y., Liu, W., & Zhang, H. (2015). Identification of coccoidal bacteria in traditional fermented milk products from Mongolia, and the fermentation properties of the predominant species, *Streptococcus thermophilus*. Korean journal for food science of animal resources, 35(5), 683-691. Doi: 10.5851/kosfa.2015.35.5.683.

Ristoff, M E. (2013). Determinación de carbohidratos en jugos de fruta con electrodos enzimáticos. (Tesis doctoral). Universidad Nacional del Sur. Bahia Blanca, Argentina.

Robyt, J. F., & Walseth, T. F. (1979). Production, purification, and properties of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. Carbohydrate research, 68(1), 95-111. Doi: 10.1016/s0008-6215(00)84059-8.

Robyt, J. F., Kimble, B. K., & Walseth, T. F. (1974). The mechanism of dextransucrase action: Direction of dextran biosynthesis. Archives of biochemistry and biophysics, 165(2), 634-640. Doi: 10.1016/0003-9861(74)90291-4.

Rodrigues, S., Lona, L. M. F., & Franco, T. T. (2003). Effect of phosphate concentration on the production of dextransucrase by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F. Bioprocess and biosystems engineering, 26(1), 57-62. Doi: 10.1007/s00449-003-0330-4.

Rodríguez, O. V., & Hanssen, H. (2007). Obtención de dextrano y fructosa, utilizando residuos agroindustriales con la cepa *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512-F. Revista EIA, (7), 159-172.

Saenz, A. C., & Prado, M. (1998). Aislamiento de cepas nativas con actividad levansacarasa. BSc Bacteriology thesis, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Bogotá, Colombia.

Sánchez, M. N. (2000). Origen y propiedades de las diversas formas observadas de la dextransacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMC. (Tesis doctoral). Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México.

Sánchez, Ó. J., Montoya, S., & Vargas, L. M. (2015). [14] Polysaccharide production by submerged fermentation. In Polysaccharides: Bioactivity and Biotechnology, pp. 451-473. Springer.

Sánchez-González, M., Alagón, A., Rodríguez-Sotrés, R., & López-Munguía, A. (1999). Proteolytic processing of dextransucrase of *Leuconostoc mesenteroides*. FEMS microbiology letters, 181(1), 25-30. Doi: 10.1111/j.1574-6968.1999.tb08822.x.

Santos, M., Teixeira, J., & Rodrigues, A. (2000). Production of dextransucrase, dextran and fructose from sucrose using *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512 (f). Biochemical Engineering Journal, 4(3), 177-188. Doi: 10.1016/S1369-703X(99)00047-9.

Sardar, M., & Gupta, M. N. (2005). Immobilization of tomato pectinase on Con A–Seralose 4B by bioaffinity layering. Enzyme and microbial technology, 37(3), 355-359. Doi: 10.1016/j.enzmictec.2005.03.007.

Sarwat, F., Qader, S. A. U., Aman, A., & Ahmed, N. (2008). Production & characterization of a unique dextran from an indigenous *Leuconostoc mesenteroides* CMG713. International Journal of Biological Sciences, 4(6), 379-386. Doi: 10.7150/ijbs.4.379.

Schoemaker, H. E., Mink, D., & Wubbolts, M. G. (2003). Dispelling the myths--biocatalysis in industrial synthesis. Science, 299(5613), 1694-1697. Doi: 10.1126/science.1079237.

Schratter, P. (2004). [12] Purification and concentration by ultrafiltration. In Protein Purification Protocols. pp 101-116. Humana Press.

Scopes Robert. (1982). Solution. In Protein Purification Principles and Practice (pp. 182-183). New York: Springer.

Sheldon, R. A. (2007). Enzyme immobilization: the quest for optimum performance. In Advanced Synthesis & Catalysis, 349(8-9), 1289-1307.

Shukla, R., Iliev, I., & Goyal, A. (2010). Purification and characterization of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1149. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 24(sup1), 576-580. Doi: 10.1080/13102818.2010.10817900.

Singh, N., Srivastava, G., Talat, M., Raghubanshi, H., Srivastava, O. N., & Kayastha, A. M. (2014). Cicer α-galactosidase immobilization onto functionalized graphene nanosheets using response surface method and its applications. Food chemistry, 142, 430-438. Doi: 10.1016/j.foodchem.2013.07.079.

Spagna, G., Barbagallo, R. N., Casarini, D., & Pifferi, P. G. (2001). A novel chitosan derivative to immobilize α-L-rhamnopyranosidase from *Aspergillus niger* for application in beverage technologies. Enzyme and microbial technology, 28(4-5), 427-438. Doi: 10.1016/s0141-0229(00)00340-9.

SPINREACT. (2017). Glucose GOD-POD. Julio 7, 2019, Sitio web: http://www.spinreact.com/es/productos/buscador.html.

Tanriseven, A., & Doğan, Ş. (2002). Production of isomalto-oligosaccharides using dextransucrase immobilized in alginate fibres. Process Biochemistry, 37(10), 1111-1115. Doi: 10.1016/S0032-9592(01)00319-3.

Terrasan, C. R.F. De Morais Junio, W. G. Contesini, F.J. (2019). Enzyme Immobilization for Oligosaccharide Production. En Encyclopedia of Food Chemistry (415-423). Brazil: Elseiver.

Tsuchiya, H. M., Koepsell, H. J., Corman, J., Bryant, G., Bogard, M. O., Feger, V. H., & Jackson, R. W. (1952). The effect of certain cultural factors on production of dextransucrase by *Leuconostoc mesenteroides*. Journal of bacteriology, 64(4), 521-526.

Ulbrich, K., & Kopeček, J. (1979). Cross-linked copolymers of N, N-diethylacrylamide with improved mechanical properties. Journal of Polymer Science: Polymer Symposia, 66 (1), 209-219. Doi: 10.1002/polc.5070660122.

Veljković, V. B., Lazić, M. L., Rutić, D. J., Jovanović, S. M., & Skala, D. U. (1992). Effects of aeration on extracellular dextransucrase production by *Leuconostoc mesenteroides*. Enzyme and microbial technology, 14(8), 665-668. Doi: 10.1016/0141-0229(92)90044-O.

Vieira, D. C., Lima, L. N., Mendes, A. A., Adriano, W. S., Giordano, R. C., Giordano, R. L., & Tardioli, P. W. (2013). Hydrolysis of lactose in whole milk catalyzed by β-galactosidase from *Kluyveromyces fragilis* immobilized on chitosan-based matrix. Biochemical engineering journal, 81, 54-64. Doi: 10.1016/j.bej.2013.10.007.

Walker, J. M. (2002). [11] SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. In The protein protocols handbook (pp. 61-67). Humana Press.

Willemot, R. M., Monsan, P., & Durand, G. (1988). Effects of dextran on the activity and stability of dextransucrase from *mesenteroides*. Annals of the New York Academy of sciences, 542(1), 169-172. Doi: 10.1111/j.1749-6632.1988.tb25823.x.

Zafar, S. B., Siddiqui, N. N., Shahid, F., Qader, S. A. U., & Aman, A. (2018). Bioprospecting of indigenous resources for the exploration of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 16(1), 1-6. Doi: 10.1016/j.jgeb.2017.10.015.