

*Universidad Nacional de La Plata*



*Facultad de Ciencias Exactas  
Departamento de Química*

---

## **TESIS DOCTORAL**

# **Producción de exopolisacáridos tipo fructooligosacaridos por *Gluconacetobacter diazotrophicus*.**

---

*María Laura Molinari*

*Dirección:  
Dr. José Luis Boiardi.*

*La Plata, Argentina  
Marzo 2011.*

Molinari, María Laura

Producción de exopolisacáridos tipo fructooligosacáridos por *Gluconacetobacter diazotrophicus*. - 1a ed. - La Plata : Universidad Nacional de La Plata, 2012.  
E-Book.

ISBN 978-950-34-0783-7

1. Polisacáridos. 2. Tesis. I. Título  
CDD 572.566

Fecha de catalogación: 08/11/2011

*El presente Trabajo de Tesis es presentado para otorgar el grado de Doctora de la Facultad de Ciencias Exactas.*

*Ha sido realizado en el Centro en Investigación Y Desarrollo en Fermentación Industriales (CINDEFI), Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP-CONICET-CCT- La Plata, bajo la dirección del Dr. José Luis Boiardi.*

*A los que me sostienen día a día,  
papá, mamá y el gran amor de mi  
vida, Rubén; y a mi ángel de la  
guarda, la abuela Albina.*

## Mis agradecimientos.

Es paradójico que estas páginas sean las primeras en leerse, ya que son la últimas que he escrito. Mis primeros reconocimientos son los formales. A todos aquellos que han aportado en algo a mi formación profesional.

Al San Vicente y a la UNQ por darme la posibilidad de acercarme a la formación académica.

Al CONICET por concederme las becas necesarias para la generación de este trabajo.

Al CINDEFI por acogerme dentro de su plantel profesional.

A la UNLP por dejarme entrar y hacerme sentir como en casa.

Al CABBIO por acercarme a los científicos del Brasil.

Ahora sí, quisiera agradecer a todos aquellos que estuvieron a mi lado. Sé que me olvidaré de algunos, de cualquier modo no dejan de ser importante para mí.

Primeramente quisiera agradecer a mi familia, a los Molinari, a los Argomaniz, a los Piazza y a los Villa, todos ellos hicieron posible que yo hoy este acá... de lo contrario no hubiera nacido. A mamá y a papá por no dejar caer los brazos cuando el camino fue duro y apoyarse siempre el uno en el otro, eso también me lo enseñaron. A Mariano, por pedir mi llegada al mundo con tanta insistencia, por elegirme el nombre y por ser siempre un modelo a seguir; a Lorena por acompañarlo en su vida y por cuidarlo mucho.

A Rubén... siempre a Rubén, él se llevo la peor parte de todo este tiempo, aguantarme... por eso mi *pololo*: muchas e infinitas GRACIAS!!!. A Diego y Leandro por dejarme entrar en sus vidas y por ser buenos hijastros. A Fiona y a Lila, esos dos canes que me alegran todas las mañanas con un lambetazo, por estar dispuestas a mover sus rabitos siempre y por ser mi cable a tierra cuando estoy sola.

A la gente del CINDEFI por hacerme pasar grandes momentos y experiencias que no voy a olvidar. A los directivos del centro, Edgardo y Roque por tratar de ponernos en carrera en este mundo científico, tan vertiginoso.

A “*los gordos del taller*”: Víctor y Carlitos por el primer mate de la mañana, por arreglarme los equipos con tanta urgencia y por dejar descargarme en los momentos de mucha tensión. A Oscar por la compañía.

A Galle por darme, no una sino muchas manos con el trabajo... por enseñarme a usar el fermentador y todos sus accesorios, por los cultivos batch y por los cultivos continuos, por tantos litros de medio hechos y filtrados. Por los reportes deportivos de los lunes a la mañana y por mantener calentito el mate del laboratorio.

A Marilyn por algunas de las actividades enzimáticas medidas y por las TLC de esta tesis. Por el asesoramiento decorativo de mi casa cuando la estaba armando, y por los consejos de moda y economía.

A Juan, por aguantarme en sus primeros pasos en el laboratorio. Espero que hayas aprendido algo de mí. Y a “*los chicos*” Gime, Vero, Damian, Manu, Pame y todos los que pasaron por el lab 4, les deseo lo mejor en esta vida... que tomen su rumbo y cuenten con una servidora, en lo que necesiten...

A Cecilia Tangorra, por ayudarme en las rendiciones de universidad, y por tener siempre un mate para compartir.

A Pepe y Flavia por abrirme las puertas del laboratorio 4 y darme total libertad para trabajar.

A Kati por la sonrisa de la mañana, y por las buenas ondas transmitidas.

Al IBBM por acogerme durante los primeros años de mi trabajo profesional. Al Dr Mariano Pistorio (*el Negro*) y al Dr Antonio Lagares (*Tony*) por enseñarme a trabajar y sobre todo a pensar. A los chicos de RPS y R3: Picho, Flor, Walter, Angui, Fede, Juli, Matias, Emilia, Augusto, Daniela B., Daniela H., Tirso, Pity, Nacho, Elias, Juli (*JPG*), Julia, Anibal por permitirme conocerlo y compartir el quehacer diario durante algunos años antes de mi ingreso al CINDEFI.

A mis compañeros de cátedra (química de correlación), he aprendido de ustedes mucho más de lo imaginable, a nivel humano y a nivel profesional.

A las malas experiencias porque de ellas he aprendido a saber qué quiero y qué no soy capaz de tolerar más. También me han enseñado a disfrutar plenamente de las buenas.

Y seguramente me olvido de alguien, pero como dije al comienzo, no dejan de ser importantes para mí.

## ÍNDICE GENERAL.

### Capítulo 1: Introducción y objetivos:

1.1.	Fructanos.	2
1.1.1.	FOS.	5
1.1.2.	Levanos.	7
1.2.	Gluconacetobacter diazotrophicus.	8
1.2.1.	Historia.	9
1.2.2.	Fijación de nitrógeno.	11
1.2.3.	Metabolismo de carbono.	12
1.2.4.	Levansacarasa.	16
1.3.	Sistema de cultivo.	19
1.3.1.	Cultivo batch.	22
1.3.2.	Cultivo continuo.	25
1.3.3.	Cultivos “batch vs cultivos continuos.	28
1.4.	Proteómica.	30
1.4.1.	Electroforesis bidimensional (2-DE).	30
1.4.2.	MALDI-TOF.	31
1.5.	Objetivos.	33

### Capítulo 2: Materiales y métodos:

2.1.	Cepa y medio de cultivo.	36
2.1.1.	Medio agar papa.	36
2.1.2.	Medio CO <sub>3</sub> <sup>=</sup> .	36
2.1.3.	Medio LGI.	37
2.1.4.	Medio LGI modificado para cultivo continuo.	37
2.2.	Biorreactor.	38
2.2.1.	Detección de gases.	38
2.3.	Determinaciones.	40
2.3.1.	Biomasa.	40
2.3.2.	Levanos.	40
2.3.3.	FOS.	40
2.3.4.	Ácido glucónico.	41
2.3.5.	Glucosa.	42
2.3.6.	Amonio.	42
2.3.7.	Actividades enzimáticas.	43
2.3.7.1.	LsdA.	43
2.3.7.2.	GDH-PQQ.	43
2.3.7.3.	GDH-NAD.	44
2.3.7.4.	GaDH.	45
2.4.	Producción de levanos en sistema batch libre de células.	46
2.4.1.	Diferentes fuentes de carbono para el crecimiento celular y posterior obtención del sobrenadante, y diferentes diluciones de sobrenadantes a 30 °C.	46
2.4.1.1.	Generación del pre-inóculo.	46
2.4.1.2.	Medios de cultivo.	46

2.4.1.3.	Diluciones empleadas.	47
2.4.2.	Diferentes temperaturas.	47
2.4.2.1.	Generación del pre-inóculo.	47
2.4.2.2.	Medio de cultivo.	47
2.4.2.3.	Diluciones empleadas.	48
2.4.3.	Diferentes concentraciones de sacarosa para diluciones constantes del sobrenadante a 40 °C.	48
2.4.3.1.	Generación del pre-inóculo.	48
2.4.3.2.	Medios de cultivo.	48
2.4.3.3.	Concentraciones de sacarosa.	49
2.4.3.4.	Diluciones empleadas.	49
2.5.	Proteómica.	50
2.5.1.	Células.	50
2.5.1.1.	Preparación de muestra.	50
2.5.1.1.1.	Lisis alcalina.	50
2.5.1.1.2.	Tratamiento con CTAB.	51
2.5.1.1.3.	Tratamiento con acetona-TCA.	51
2.5.1.2.	Electroforesis SDS-PAGE.	51
2.5.1.3.	Electroforesis 2D.	53
2.5.2.3.1.	Isoelectroenfoque – primera dimensión.	53
2.5.2.3.2.	Gel SDS-PAGE – segunda dimensión.	54
2.5.2.4.	Análisis software.	56
2.5.2.	Sobrenadantes.	56
2.5.2.1.	Preparación de muestra.	56
2.5.2.1.1.	Tratamiento con CTAB.	56
2.5.2.1.2.	Tratamiento con acetona-TCA.	57
2.5.2.1.3.	Tratamiento mediante dializado.	57
2.5.2.2.	Electroforesis SDS-PAGE.	58
2.5.2.3.	Electroforesis 2D.	58
2.5.2.3.1.	Isoelectroenfoque – primera dimensión.	59
2.5.2.3.2.	Gel SDS-PAGE – segunda dimensión.	59
2.5.2.4.	Análisis software.	60
2.6.	Purificación y análisis de proteínas de membrana.	61
2.7.	MALDI-TOF/TOF.	62
2.7.1.	Preparado de la muestra.	62
2.7.1.1.	Extracción y digestión trípica de proteínas.	62
2.7.1.1.	Preparado de la matriz.	62
2.7.2.	Condiciones de operación.	63
2.7.3.	Búsqueda en base de datos.	63

### **Capítulo 3: Cultivos Batch de *Gluconacegobacter diazotrophicus* con sacarosa como fuente de carbono y energía:**

3.1.	Cultivos batch y producción de biomasa.	65
3.1.1.	Diferentes concentraciones iniciales de sacarosa.	65
3.1.2.	FBN.	70
3.1.3.	Diferentes fuentes de nitrógeno.	72
3.1.4.	Sin control de pH.	74
3.2.	Producción de ácido glucónico y ceto-ácidos en cultivos batch de <i>G. diazotrophicus</i> con sacarosa.	77



3.2.1. Detección de ácido glucónico y ceto-ácidos en sobrenadantes de cultivos batch.	77
3.2.2. Producción de ácido glucónico y ceto-ácidos en cultivos batch con diferentes concentraciones iniciales de sacarosa.	79
3.2.3. Producción de ácido glucónico y ceto-ácidos en cultivos batch con diferentes condiciones de fuente de nitrógeno.	81
3.2.4. Producción de ácido glucónico y ceto-ácidos en cultivos batch sin control de pH.	82

#### **Capítulo 4: Cultivos continuos de *Gluconacetobacter diazotrophicus* con sacarosa como fuente de carbono y energía:**

---

4.1. Cultivos continuos y velocidades específicas.	86
4.2. Formación de productos en cultivos continuos.	91
4.2.1. Formación de ácido glucónico y ceto-ácidos.	91
4.2.2. Producción de FOS y levanos.	93
4.3. Estequiometría de crecimiento.	97
4.4. Proteómica.	101
4.4.1. Selección de la preparación de muestra.	102
4.4.1.1. Células.	102
4.4.1.2. Sobrenadantes.	104
4.4.2. MALDI-TOF/TOF.	107
4.4.3. Proteínas de membrana.	108

#### **Capítulo 5: Producción de FOS y levanos por *Gluconacetobacter diazotrophicus*:**

---

5.1. Introducción.	111
5.2. Producción de levanos en sistema batch libre de células.	113
5.2.1. Estudios con diferentes sobrenadantes.	114
5.2.2. Estudios con diferentes temperaturas.	117
5.2.3. Estudios con diferentes concentraciones de sacarosa.	118
5.3. Producción de FOS en sistema batch libre de células.	121
5.4. Producción de levanos en cultivos batch.	124
5.4.1. Diferente concentración inicial de sacarosa.	124
5.4.2. Diferentes fuentes de nitrógeno.	125
5.4.3. Sin control de pH.	126
5.5. Producción de FOS en cultivos batch.	129
5.6. Síntesis de LsdA en cultivos batch.	131

#### **Capítulo 6: Conclusiones:**

---

6.1. Conclusiones generales.	136
------------------------------	-----

#### **Capítulo 7: Referencias bibliográficas:**

---

7.1. Referencias bibliográficas consultadas en el desarrollo de esta tesis.	141
---	-----

## ÍNDICE DE FIGURAS.

<b>Figura 1:</b> Estructura química de los dos principales fructooligosacáridos producidos naturalmente. A) 1-Kestosa, B) Nistosa.	6
<b>Figura 2:</b> Estructura química de los levanos donde n varía desde 10 hasta 10 <sup>6</sup> .	7
<b>Figura 3:</b> Esquema simplificado del metabolismo de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> creciendo en sacarosa.	13
<b>Figura 4:</b> Posibles rutas metabólicas para la reducción de los hidratos de carbono en <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> .	15
<b>Figura 5:</b> Ruta de oxidación directa de la glucosa en <i>G. diazotrophicus</i> .	16
<b>Figura 6:</b> Pasos catalizados por LsdA a partir de sacarosa como sustrato.	17
<b>Figura 7:</b> Esquema de un biorreactor funcionando en “batch”.	23
<b>Figura 8:</b> Esquema de un reactor funcionando en cultivo continuo.	26
<b>Figura 9:</b> Biomasa (g/l) y DO vs tiempo (h). Cultivo batch con 10 g/l de sacarosa como fuente de carbono y energía y 3 g/l de (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> como fuente de nitrógeno con pH controlado, pH = 6,0.	66
<b>Figura 10:</b> Biomasa (g/l) y DO vs tiempo (h). Cultivo batch con 100 g/l de sacarosa como fuente de carbono y energía y 3 g/l de (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> como fuente de nitrógeno con pH controlado, pH = 6,0.	66
<b>Figura 11:</b> Biomasa (g/l) vs tiempo (h) de cultivos batch con 20 g/l de sacarosa y 100 g/l de sacarosa en condiciones de FBN con pH controlado, pH = 6,0.	70
<b>Figura 12:</b> Espectro de absorción UV-visible (200 nm – 400 nm), y tabla de determinación de picos de absorción de: (A) ácido glucónico (5 g/l), (B) ácido 5-ceto-glucónico (5g/l).	78
<b>Figura 13:</b> Cromatogramas de HPLC: (A) patrón de ácido glucónico (5 g/l), λ = 210 nm. (B) patrón de ceto-ácidos (5 g/l), λ = 279 nm. (C1) ácido glucónico + ceto-ácidos (5g/l) λ = 210 nm, (C2) ácido glucónico + ceto-ácidos (5g/l) λ = 279.	78
<b>Figura 14:</b> Ácido glucónico (g/l) y biomasa (g/l) vs tiempo (h) de cultivo batch con 10 g/l de sacarosa como fuente de carbono y energía y 3 g/l de (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> como fuente de nitrógeno con pH controlado, pH = 6,0.	80
<b>Figura 15:</b> Ácido glucónico (g/l) y biomasa (g/l) vs tiempo (h) de cultivo batch con 100 g/l de sacarosa como fuente de carbono y energía y 3 g/l de (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> como fuente de nitrógeno con pH controlado, pH = 6,0.	80

- Figura 16:** Ácido glucónico (g/l), ceto-ácidos y biomasa (g/l) vs tiempo (h) de cultivo batch con 100 g/l de sacarosa como fuente de carbono y energía y FBN con pH controlado, pH = 6,0. 82
- Figura 17:** Ácido glucónico (g/l), biomasa (g/l) y pH vs tiempo (h) de cultivo batch con 100 g/l de sacarosa como fuente de carbono y energía, con 1,5 g/l extracto de levaduras + 1,5 g/l triptona. Sin pH controlado. 83
- Figura 18:** Ácido glucónico (g/l), biomasa (g/l) y pH vs tiempo (h) de cultivo batch con 20 g/l de sacarosa como fuente de carbono y energía, con 1,5 g/l extracto de levaduras + 1,5 g/l triptona. pH no controlado. 84
- Figura 19:** TLC de cultivos continuos. F+S: patrón de fructosa + sacarosa (5 g/l), K+N: patrón de 1-kestosa + nistosa (5 g/l). 1: sobrenadante de C.C. con 20 g/l de sacarosa y NoFBN; 2: sobrenadante de C.C. con 20 g/l y FBN; 3: sobrenadante de C.C. con 100 g/l de sacarosa y NoFBN; 4: sobrenadante de C.C. con 100 g/l de sacarosa y FBN. 95
- Figura 20:** Perfil de la IEF finalizada. La línea azul es el comportamiento de voltaje del programa original y la línea roja el comportamiento de voltaje de la muestra. 103
- Figura 21:** Electroforesis 2D de células sonicadas sin tratamiento para la extracción de proteínas. Muestra del C.C. de *G. diazotrophicus* PAL 5 wt con 100 g/l de sacarosa y 3 g/l de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  con control de pH. 103
- Figura 22:** Electroforesis 2D de células sonicadas tratadas con CTAB para la extracción de proteínas. Muestra del C.C. de *G. diazotrophicus* PAL 5 wt con 100 g/l de sacarosa y 3 g/l de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  con control de pH. 103
- Figura 23:** Electroforesis 2D de células sonicadas tratadas con TCA para la extracción de proteínas. Muestra del C.C. de *G. diazotrophicus* PAL 5 wt con 100 g/l de sacarosa y 3 g/l de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  con control de pH. 104
- Figura 24:** Perfil de la IEF en el paso 3. La línea azul es el comportamiento de voltaje del programa original y la línea roja el comportamiento de voltaje de la muestra. 105
- Figura 25:** Electroforesis 2D de sobrenadante dializado de C.C. de *G. diazotrophicus* PAL 5 wt con 20 g/l de sacarosa y 3 g/l de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  . 106
- Figura 26:** Electroforesis 2D de sobrenadante dializado de C.C. de *G. diazotrophicus* PAL 5 wt con 20 g/l de sacarosa y FBN. 106
- Figura 27:** Electroforesis 2D de sobrenadante dializado de C.C. de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL 5 wt con 100 g/l de sacarosa y 3 g/l de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . 106

- Figura 27:** Electroforesis 2D de sobrenadante dializado de C.C. de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL 5 wt con 100 g/l de sacarosa y 3 g/l de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . 108
- Figura 29:** SDS-PAGE de proteínas de membrana de C.C. de *G. diazotrophicus* PAL 5. Calle 1-4 proteínas de membrana interna, 1: 20 g/l de sacarosa + NoFBN, 2: 20 g/l de sacarosa + FBN, 3: 100 g/l de sacarosa + NoFBN, 4: 100 g/l de sacarosa + FBN. 5: patrón de peso molecular. Calles 6-9 proteínas de membrana externa, 6: 20 g/l de sacarosa + NoFBN, 7: 20 g/l de sacarosa + FBN, 8: 100 g/l de sacarosa + NoFBN, 9: 20 g/l de sacarosa + FBN. 109
- Figura 30** Producción de levanos en sistema de incubación batch libre de células. Diferentes medios para la generación de los sobrenadantes a 30 °C. 115
- Figura 31:** Producción de levanos (g/l) a lo largo del tiempo con dos sobrenadantes (rojo = glicerol; azul = sacarosa), a 30 °C y distintas diluciones del sobrenadante. 116
- Figura 32:** Producción de levanos (g/l) a lo largo del tiempo, bajo dos temperaturas ambientales (rojo = 40 °C; azul = 30 °C) y distintas diluciones del sobrenadante proveniente de un cultivo de *G. diazotrophicus* con sacarosa. 118
- Figura 33:** Producción de levanos con diferentes concentraciones de sacarosa (rojo = 300 g/l de sacarosa; azul = 700 g/l de sacarosa), a 40 °C y diferentes diluciones del sobrenadante proveniente de un cultivo de *G. diazotrophicus* con sacarosa. 119
- Figura 34:** TLC de incubaciones a 40 °C. F+S: patrón de fructosa y sacarosa; N+K: patrón de 1-nistosa y 1-kestosa; 1-4 muestra con 300 g/l de sacarosa. 122
- Figura 35:** Porcentaje máximo de sacarosa convertido en levanos para cultivos batch con 3 g/l de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  con control de pH. 125
- Figura 36:** Porcentaje máximo de sacarosa convertido en levanos para cultivos batch con 20 y 100 g/l de sacarosa y diferentes fuentes de nitrógeno, con control de pH. 125
- Figura 37:** Porcentaje máximo de sacarosa convertido en levanos para cultivos batch con 20 y 100 g/l de sacarosa y diferentes fuentes de nitrógeno, sin control de pH. 127
- Figura 38:** TLC de cultivo batch con 20 g/l de sacarosa y 3 g/l de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  con control de pH. F+S: patrón de fructosa y sacarosa. 129
- Figura 39:** Actividad enzimática específica (UE/g de biomasa) en sobrenadantes de cultivos con 3 g/l de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y diferentes concentraciones de sacarosa, con control de pH. 133
- Grafico 40:** Actividad enzimática específica (UE/g de biomasa) en sobrenadantes de cultivos con 20 g/l y 100 g/l de sacarosa y diferentes calidades de fuente de 133

nitrógeno, con control de pH.

**Figura 41:** Actividad enzimática específica (UE/g de biomasa) en sobrenadantes 134  
de cultivos con 20 g/l y 100 g/l de sacarosa y diferentes calidades de fuente de  
nitrógeno, sin control de pH.

## ÍNDICE DE TABLAS.

<b>Tabla 1:</b> Valores máximos de biomasa (g/l), DO y rendimiento (g biomasa/g sacarosa) para cultivos batch de <i>G. diazotrophicus</i> PAL 5 con control de pH frente a concentraciones variables de sacarosa y 3 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fuente de nitrógeno.	67
<b>Tabla 2:</b> Valores máximos de biomasa (g/l), DO y rendimiento (g biomasa/g sacarosa) para cultivos batch de <i>G. diazotrophicus</i> PAL 5 en FBN, con control de pH.	71
<b>Tabla 3:</b> Valores máximos obtenidos de biomasa (g/l), DO y rendimiento (g biomasa/g sacarosa) para cultivos batch de <i>G. diazotrophicus</i> PAL 5 con control de pH y fuente de nitrógeno variable. E.L.= extracto de levaduras.	73
<b>Tabla 4:</b> Valores máximos obtenidos de biomasa (g/l) y rendimiento (g biomasa/g sacarosa) para cultivos batch de <i>G. diazotrophicus</i> PAL 5 sin control de pH y fuente de nitrógeno y carbono y energía variables.	75
<b>Tabla 5:</b> Cocientes respiratorios obtenidos en C.C. de <i>G. diazotrophicus</i> durante el estado estacionario con variación en la concentración de fuente de carbono y energía y diferentes condiciones de fuente de nitrógeno. sac = sacarosa.	88
<b>Tabla 6:</b> Biomasa (g/l), y velocidad de crecimiento $r_x$ (g/l.h), en el E.E. de cada status nutricional ensayado. sac = sacarosa.	88
<b>Tabla 7:</b> Velocidades específicas en E.E.: $q_{O_2}$ , consumo de $O_2$ en milimoles de $O_2$ consumido / gramo de biomasa . hora; $q_{CO_2}$ , formación de $CO_2$ en milimoles de $CO_2$ consumido / gramo de biomasa.hora; $y_{x/s}$ rendimiento de biomasa en gramo de biomasa / mol de sacarosa. sac = sacarosa.	89
<b>Tabla 8:</b> Velocidades específicas de: $q_{ác}$ , producción de ácido glucónico en mmoles de ácido glucónico/g de biomasa.hora; $y_{ác/sac}$ rendimiento de producción d ácido glucónico en gramos de ácido glucónico/moles de sacarosa; $q_{gluc}$ , liberación de glucosa en mmoles de glucosa/gramos de biomasa.hora; $y_{gluc/sac}$ rendimiento de glucosa liberada en gramos de glucosa/mole de sacarosa, de cultivos continuos en estado estacionario.	92
<b>Tabla 9:</b> Actividad específica de LsdA (UE/g biomasa) obtenida en sobrenadantes de cultivos continuos durante el estado estacionario. sac = sacarosa.	94
<b>Tabla 10:</b> Concentración de levanos (g/l) producidos por <i>G. diazotrophicus</i> en cultivos continuos frente a diferentes condiciones nutricionales. sac = sacarosa.	96
<b>Tabla 11:</b> Parámetros cinéticos y rendimientos obtenidos de los C.C. en: limitación en fuente de carbono y energía (20 g/l de sacarosa) y no limitación en sacarosa (100 g/l), en fijación biológica de nitrógeno (FBN) y en presencia de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	98

(NoFBN).

**Tabla 12:** Producción máxima de levanos (g/l) en sistema libre de células. 120  
Rendimiento en porcentaje de sacarosa convertida en levanos.

# Capítulo 1:

Introducción general y objetivos.





## 1.1. Fructanos

Un gran número de especies bacterianas que viven asociadas a plantas producen exopolisacáridos a partir de la sacarosa suministrada por el vegetal. Estos polisacáridos son sintetizados mediante reacciones sucesivas de transglicosilación y generalmente desempeñan un papel importante en la interacción huésped-hospedador (Leigh y Coplin, 1992). Dentro de estos polisacáridos podemos encontrar a los fructanos.

Se denominan fructanos a aquellos polisacáridos constituidos únicamente por unidades de fructosa. Esta definición es independiente del tamaño de la molécula, encontrándose fructanos que contienen desde dos hasta más de  $10^6$  unidades constituyentes (Waterhouse y Chatterton, 1993) formando un polímero lineal o ramificado. La estructura química de los fructooligosacáridos naturales comprende una sacarosa inicial seguida de un número variable de residuos de fructosa que en su forma  $\beta$ -D-furanosa se unen entre sí por enlaces glicosídicos. Estos enlaces se establecen entre el carbono reductor (C-2) de la fructofuranosa entrante y los oxígenos de las posiciones 1 ó 6 (O-1 ó O-6) del residuo precedente. La pérdida del átomo de hidrógeno (H) reactivo de la posición C-2 de todos los residuos fructosilos de la cadena determina la ausencia del poder reductor en los fructanos y asegura una elevada estabilidad conformacional (Waterhouse y Chatterton, 1993).

Dentro de los fructanos se puede establecer una distinción según el grado de polimerización, entendiéndose a éste como el número de unidades monoméricas constituyentes. Así se reserva la denominación de fructooligosacáridos (FOS) para aquellos que contienen un grado de polimerización inferior a 8-10, y de levanos para aquellos que poseen grados de polimerización mayores a 10-15. Cabe mencionar que no existe una razón fisicoquímica o química que marque los límites entre los FOS y levanos (Biedrzycka y Bielecka, 2004).

Los fructanos no son digeribles (NDF por su siglas en Inglés Non-Digeribles Fructans) por el hombre por carecer de las enzimas responsables de su hidrólisis. Esta propiedad da a los oligosacáridos la posibilidad de ser usados como edulcorantes, fibras dietarias bajas en calorías y compuestos seguros para individuos diabéticos. (Crittenden y Playne, 1996; Rivero-Urgell y Santamaría-Orleans, 2001; Mussatto y Mancilha, 2007). Por lo que, éste tipo de carbohidratos presenta gran interés en la industria alimenticia ya que se

les atribuyen una serie de propiedades beneficiosas para la salud del consumidor, y también pueden ser utilizados como espesantes y estabilizantes de alimentos. Consecuentemente, los oligosacáridos son carbohidratos de bajo peso molecular clasificados como oligosacáridos digeribles por la flora gastrointestinal humana, mientras que los levanos de alto peso molecular, clasificados como no-digeribles microbiológicamente (Biedrzycka y Bielecka, 2004).

Aunque las propiedades fisiológicas beneficiosas de los fructanos son demostradas para el caso de la inulina (polifrufructano lineal producido naturalmente por las plantas), se supone que al no haber diferencias significativas en el comportamiento químico de los levanos con respecto a la inulina, se les pueden atribuir las mismas propiedades a ambos fructanos.

El metabolismo de los fructooligosacáridos por fermentación microbiana conduce, no sólo a la generación de energía para la proliferación bacteriana sino también a la producción de gases como H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> y ácidos grasos de cadena corta (Short-Chain Fatty Acids- SCFA) como acetato, propionato, butirato y lactato, los cuales son utilizados por los organismos huéspedes. Por tanto, aunque no proveen al cuerpo con monosacáridos, los NDF actúan indirectamente como una fuente de energía (Mussatto y Mancilha, 2007).

El tracto gastrointestinal está poblado con bacterias anaeróbicas estrictas. Estas bacterias colonizan principalmente el colon, siendo ésta una comunidad extremadamente compleja. Debido a su estructura química, los NDF son sustratos que solo pueden ser consumidos por un número limitado de bacterias, estimulando su crecimiento. La mayoría de estas bacterias se encuentran en el tracto gastrointestinal siendo principalmente bifidobacterias y lactobacillus los microorganismos que se encuentran en estas condiciones (Mussatto y Macilha, 2007).

La velocidad de fermentación de estos polisacáridos depende del grado de ramificación, la cantidad de energía obtenida por la bacteria a partir de dicha fermentación, la relación bacteria/sustrato, la naturaleza de la fermentación y la capacidad sacarolítica de los fructanos (Voragen, 1998). La fermentación bacteriana de los NDF en el colon produce un efecto beneficioso para la salud humana por las siguientes razones (Mussatto y Mancilha, 2007);

- 1. Una modificación significativa de la microflora del colon:** Los oligosacáridos sirven como sustrato para el crecimiento y proliferación de bacterias

anaeróbicas, principalmente bifidobacterias, las cuales inhiben el crecimiento de bacterias de putrefacción y/o patógenos presentes en el colon.

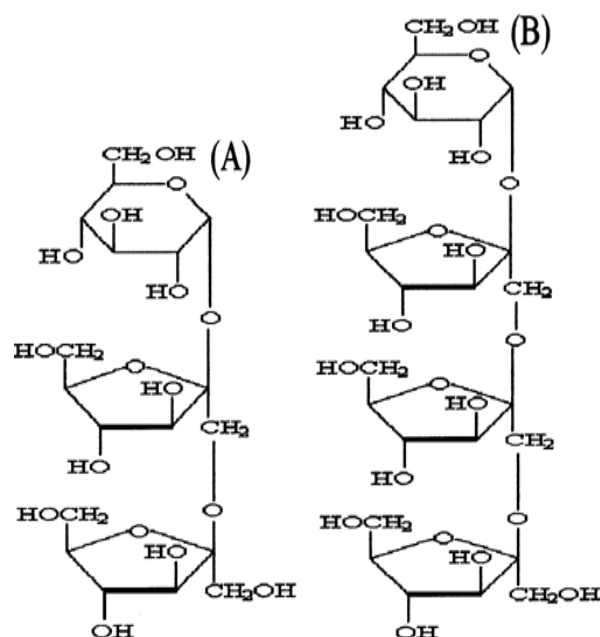
- 2. Un decrecimiento del pH en el colon resultado de la producción de SCFA:** Bajos valores de pH inhiben el crecimiento de ciertas especies bacterianas patogénicas, mientras que la estimulación del crecimiento de las bifidobacterias es a raíz de compuestos derivados del ácido láctico.
- 3. Producción de nutrientes:** Nutrientes como vitaminas del grupo B (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub> y B<sub>12</sub>), ácido nicotínico y fólico son producidos a partir de SCFA que son de importancia en la nutrición humana.
- 4. Un aumento en la excreción de materia fecal:** La proliferación de la microflora intestinal humana afecta de forma directa la producción de materia fecal, ya que estos microorganismos son responsables de la producción de la misma.
- 5. Alivio en la constipación por el aumento en la producción de materia fecal y de la movilidad intestinal.** La característica de no digestibilidad de los NDF significa que ellos tienen un efecto similar a las fibras dietarias, que previenen la constipación. Los productos finales de la fermentación de los NDF, los SCFA, son eficientemente absorbidos y utilizados por las células epiteliales del colon humano, esto también estimula el crecimiento celular, la absorción de sales y agua, incrementando la humedad del bolo fecal, su presión osmótica y la movilidad intestinal.
- 6. Inhibición de diarreas asociadas a la infección intestinal.**
- 7. Protección ante posibles infecciones** gastrointestinales, respiratorias y del tracto urogenital, lo cual se debe a la inhibición de adhesión de patógenos superficial a las células epiteliales.
- 8. Un incremento en la adsorción de diferentes minerales** como hierro, calcio y magnesio, lo cual es debido a la capacidad quelante de los NDF. El incremento en la absorción de calcio, en particular, reduce el riesgo de osteoporosis ya que este mineral promueve un incremento en la densidad y masa de los huesos. La hipótesis más promovida para explicar este efecto es una absorción del mineral por los NDF su efecto osmótico, acidificación del contenido del colon por la fermentación y la producción de SCFA, formación de sales de calcio y magnesio de estos ácidos, hipertrofia de la pared del colon.

- 9. Efecto beneficioso en el metabolismo de carbohidratos y lípidos**, debido al decaimiento en la concentración sanguínea de colesterol, triglicéridos y fosfolípidos, reduciendo así el riesgo de contraer diabetes y obesidad. Los cambios en la concentración de colesterol en suero ha sido relacionado con cambios en la microflora intestinal. Algunas cepas de *Lactobacillus acidophilus* asimilan el colesterol presente en el medio, mientras que otras parecen inhibir la absorción del colesterol por las paredes intestinales. Por otro lado, el cambio en el metabolismo lipídico fue sugerido como una consecuencia de una adaptación metabólica inducida por SCFA.
- 10. Reducción en el riesgo de contraer cáncer**, principalmente cáncer de intestino. Este efecto antitumoral se relaciona con un incremento en la inmunidad celular, los componentes de las paredes celulares y los componentes extracelulares de las bifidobacterias. Parámetros fisicoquímicos de la materia fecal, como ser pH, amonio, p-cresol e indol son considerados como factores de riesgo no solo para contraer cáncer de colon sino también para generar desordenes sistémicos.

Todos los efectos antes mencionados benefician la salud del consumidor, es por esta razón que los NDF son considerados alimentos funcionales (Rivero-Urgell y Santamaría-Orleans, 2001; Roberfroid y Slavin, 2000), los cuales pueden ser definidos como “*un ingrediente alimentario no digerible que afecta de modo beneficioso al huésped*” (Roberfroid, 1996). Además, muchos de los NDF son clasificados como prebióticos porque estimulan selectivamente el crecimiento y/o la actividad metabólica de especies bacterianas beneficiosas para la salud alojadas en el colon, promoviendo una mejora de la composición de este ecosistema (Mussatto y Mancilha, 2007).

### 1.1.1. FOS

Como ya se indicó antes, éste tipo de fructanos son constituidos por unidades de fructosa unidas por enlaces  $\beta$  (2-6) y no superan las 10 unidades formando un polímero lineal. Los FOS constituyen una serie de oligosacáridos homólogos derivados de la sacarosa usualmente representado por la fórmula  $GF_n$ , como se describe en la figura 1. Los dos FOS más representativos son 1-kestosa y nistosa.(Yun, 1996)



**Figura 1:** Estructura química de los dos principales fructooligosacáridos producidos naturalmente. A) 1-Kestosa, B) Nistosa.

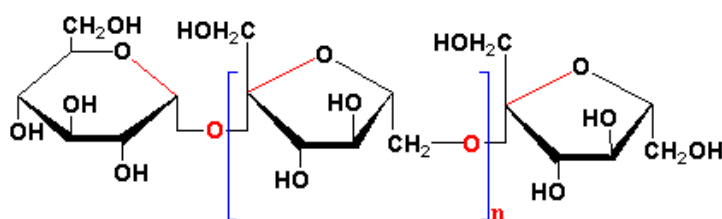
Éstos producen cristales finos rápidamente. Comparando soluciones al 10% de 1-kestosa, nistosa y 1<sup>F</sup>-fructofuranosil nistosa con una solución de sacarosa de igual concentración, los oligosacáridos mantienen el 31, 22 y 16% del poder edulcorante de la sacarosa, respectivamente. Los FOS son altamente higroscópicos, lo cual dificulta el almacenamiento de productos liofilizados en condiciones atmosféricas por tiempos prolongados. La viscosidad de una solución de FOS es relativamente más alta que la de la sacarosa a la misma concentración y poseen una mayor estabilidad térmica (Neosugar User's guide, Meiji Seika Co., Kawasaki-Shi, Japan, 1982). También los FOS son altamente estables en un rango de pH desde 4,0 hasta 7,0; valores normales en alimentos.

En respuesta a un incremento en la demanda del consumo de alimentos de bajas calorías desde los años '80 se está estudiando la capacidad edulcorante de compuestos alternativos como ciertos oligosacáridos entre los que podemos mencionar isomaltooligosacáridos, oligosacáridos de soja y fructooligosacáridos, los cuales poseen grados edulcorantes semejantes o inferiores a la sacarosa. Todos estos compuestos son nuevos productos introducidos al mercado donde los FOS presentan una mayor

atracción que es atribuida principalmente a que su producción a gran escala no es complicada y a que el gusto dulce es muy similar de la sacarosa (Yun, 1996).

### 1.1.2. Levanos

Anteriormente se definió a este tipo de fructanos constituidos por unidades de fructosa unidas por enlaces  $\beta$  (2-6) que superan las 10 unidades pudiendo llegar hasta las  $10^6$  unidades del azúcar formando una cadena polimérica lineal (figura 2). En muchos casos a estos fructanos se los encasilla dentro de los polisacáridos no digeribles por la flora gastrointestinal humana. Estas moléculas de carbohidratos pueden ser extraídas de fuentes naturales o pueden ser producidos de forma química por hidrólisis de polisacáridos de mayor peso molecular, o por síntesis química o enzimática a partir de disacáridos como la sacarosa.



**Figura 2:** Estructura química de los levanos donde  $n$  varía desde 10 hasta  $10^6$ .

Los levanos son solubles en agua y su poder edulcorante depende de la estructura química y el grado de polimerización. (Crittenden y Playne, 1996; Voragen, 1998). De acuerdo con Roberfroid y Slavin (2000) el dulzor decrece con el aumento en el grado de polimerización del polisacárido. De todas formas, los levanos poseen importantes propiedades fisicoquímicas que promueven su uso como ingredientes alimenticios. Una de las características más utilizadas es la incapacidad de los microorganismos, aun de los alojados en el colon, de degradarlos. Consecuentemente, la producción de ácidos y poliglucanos microbianos no ocurre, por lo que los levanos son edulcorantes no criogénicos, pudiendo sustituir a la sacarosa en la producción de goma de mascar, yogures y bebidas (Mussatto y Mancilha, 2007).

## 1.2. *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

*G. diazotrophicus* es una especie fijadora de N<sub>2</sub> incluida dentro del género *Gluconacetobacter* (Holt *et al.*, 1994). La bacteria coloniza de forma endófito la caña de azúcar sin producir síntomas visibles de patogenicidad (Döbereiner *et al.*, 1995; James y Olivares, 1997); también vive asociada a otras plantas como ser: batata y sorgo (Paula *et al.*, 1991, 1992), hierba camerunesa (Döbereiner *et al.*, 1993), café (Jiménez-Salgado *et al.*, 1997) y piña (Tapia-Hernández *et al.*, 2000). Todos estos hospedadores, excepto el café, presentan una consistencia herbácea, son ricos en sacarosa y se propagan de forma vegetativa, aspecto este último que constituye, a su vez, la principal vía natural de diseminación bacteriana. Este hábitat relativamente homogéneo y la permanencia de la bacteria durante varias generaciones dentro de un mismo cultivo, fueron considerados las causas fundamentales de la escasa diversidad genética existente a nivel de la especie (Caballero-Mellado *et al.*, 1995).

La diversidad y número de bacterias rizosféricas es muy grande, lo cual ocasiona la existencia de una fuerte competencia por los nutrientes. Sobre esta base se ha considerado que las bacterias endófitas podrían tener algunas ventajas competitivas sobre las bacterias rizosféricas, ya que la disponibilidad de nutrientes es mayor en el interior de las plantas y el número de microorganismos endófitos es menor que el de los rizosféricos (James, 2000). Por otro lado, las bacterias endófitas se encuentran mejor protegidas que las rizosféricas de las condiciones adversas medioambientales (Reinhold-Hurek y Hurek, 1998). Existen varias conductas beneficiosas que se les atribuyen a las bacterias endófitas generando resultados más directos a su hospedante en comparación con las bacterias rizosféricas. A *G. diazotrophicus* se le conocen múltiples mecanismos para promover el crecimiento vegetal, como por ejemplo la producción de fitohormonas como el ácido indol acético (IAA) y el ácido giberélico (GA) en el interior de las plantas; la solubilización de micro y macro-nutrientes para la planta como fósforo y zinc; y biocontrol de fitopatógenos como *Colletotrichum falcatum*, *Xanthomonas albilineans* y nematodos como *Meloidogyne incognita* (Saravanan *et al.*, 2007). Por todas estas características se considera a *Gluconacetobacter diazotrophicus*, una de las bacterias endofíticas mejor estudiadas y un microorganismo modelo para evaluar la interacción planta-bacteria.

### 1.2.1. Historia

Los primeros aislamientos de *G. diazotrophicus* fueron realizados a partir de plantas de caña de azúcar en diferentes estados de Brasil y se publicaron bajo la denominación de *Sacchrobacter nitrocaptans* por Cavalcante y Döbereiner en 1988. Las características principales observadas en la especie fueron: la capacidad de fijar N<sub>2</sub>, el crecimiento óptimo en medios ácidos y la posibilidad de oxidar el etanol, inicialmente hasta ácido acético y luego hasta CO<sub>2</sub> y agua.

Luego de la realización de experimentos de hibridación a esta bacteria se le dio el nombre de *Acetobacter nitrocaptans*. Poco después Gillis *et al.* (1989), mediante la realización de hibridaciones de ADN-ARN ribosomal sobre la presencia de flagelos y la capacidad de oxidar acetato y lactato hasta CO<sub>2</sub> y agua, propusieron el nombre oficial de *Acetobacter diazotrophicus* y definieron la cepa tipo LMG 7603 (Döbereiner PAL 5T = ATCC 49037). Por su parte Yamada *et al.* en 1998 realizaron un nuevo esquema taxonómico de la familia *Acetobacteraceae*, y el primer fijador de Nitrógeno descrito en esta familia fue denominado oficialmente como *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

Históricamente la familia *Acetobacteraceae* se ha dividido en los géneros *Acetobacter* y *Gluconobacter* (De Ley *et al.*, 1984; Swings, 1992). Por su parte, la clasificación de las bacterias acéticas ha sido materia de controversia durante largo tiempo (Bulygina *et al.* 1992, Sievers *et al.* 1994, Swings 1992, Urakami *et al.* 1989). La división de la familia *Acetobacteraceae* en los géneros *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconoacetobacter* y *Acidomonas*, basándose en secuencias parciales del gen 16S rRNA y del tipo de ubiquinona predominante propuesta por Yamada *et al.* en 1998, establecieron la inclusión en el género *Acetobacter* de las especies que tienen el tipo de ubiquinona Q9, entre las que se encuentran *Acetobacter aceti* y *Acetobacter pasteurianus*, en tanto que las otras especies de *Acetobacter* equipadas con ubiquinona Q10 como *A. diazotrophicus*, fueron transferidas al género *Gluconoacetobacter*, con la especie tipo *Gluconoacetobacter liquefaciens*. En este género también fueron incluidas las especies *G. xylinus*, *G. hansenii*, y *G. europaeus*. El nombre de *Gluconoacetobacter* fue corregido a *Gluconacetobacter* (Yamada *et al.*, 1998), con base en la regla 61 del código internacional de nomenclatura bacteriana. Otras cuatro posibles nuevas especies de *Acetobacter* se aislaron de vinagre u otras fermentaciones ácidas y se identificaron con los nombres *A. polyoxogenes* (Entani *et al.*, 1985), *A. intermedius* (Boesch *et al.*,



1998), *A. oboediens* y *A. pomorum* (Sokollek *et al.*, 1998). Actualmente, *A. oboediens* y *A. intermedius* han sido asignadas al género *Gluconacetobacter* (Franke *et al.*, 1999, Yamada *et al.*, 2000), junto con *G. sacchari* (Franke *et al.*, 1999), *G. johannae* (en honor a Johanna Döbereiner) y *G. azotocaptans* (Fuentes-Ramírez *et al.*, 2001).

La familia *Acetobacteraceae* pertenece a la subclase  $\alpha$ -Proteobacteria (Young *et al.*, 1992). Son bacterias aeróbicas, Gram (-), ó Gram variables que se caracterizan fenotípicamente por su capacidad de oxidar etanol a ácido acético en medios de cultivo con pH neutro ó ácido (De Ley *et al.*, 1984; Swings, 1992). Son catalasa (+) y oxidasa (-). Según Gillis *et al.* ésta familia microbiana se desarrolla como bacterias en forma de cilindros rectos de extremos redondeados, tamaño 0,7 – 0,9  $\mu\text{m}$  y móviles con flagelación lateral o peritrica. Su crecimiento es óptimo a pH 5,5 y 30 °C, produce ácido 2-cetoglucónico y 2,5-cetoglucónico a partir de glucosa, así como pigmentos solubles de color carmelita en medio GYC (Stephan *et al.*, 1991). Libera ácido acético y forma colonias de color amarillo-naranja en medio LGI sólido con el agregado de azul de bromotimol como indicador de pH (Cavalcante y Döbereiner, 1988), aspecto que diferencia a esta especie de otras bacterias diazotróficas (Alvarez y Martínez-Dretz, 1995). En medios con  $\text{CO}_3\text{Ca}$  crece formando un halo de solubilización debida a la formación de ácidos orgánicos. La especie *G. diazotrophicus* puede ser diferenciada de las otras especies fijadoras de nitrógeno del género por la formación de colonias de color café oscuro (chocolate) con bordes claros, en un medio de cultivo a base de extracto de papa enriquecido con 5; 10 ó 15 % p/v de sacarosa, después de 5 a 7 días de incubación (Fuentes-Ramírez *et al.*, 2001). Mientras que las especies *G. johannae* y *G. azotocaptans* permanecen de color “beige” ó crema aún después de 10 días de incubación.

*G. diazotrophicus* se considera una bacteria endofítica obligada ya que sobrevive muy pobremente en el suelo y necesita del ambiente de la planta hospedera para realizar sus funciones vitales (Döbereiner *et al.*, 1993; Baldani *et al.*, 1997). Otros autores no concuerdan con el uso del término obligada porque la bacteria puede crecer en medios de cultivos sin extractos vegetales (Reinhol-Hurek y Hurek, 1998), así como también fijar nitrógeno en vida libre.

## 1.2.2. Fijación de nitrógeno

El interior de las plantas es un ambiente propicio para que se lleve a cabo la fijación biológica de nitrógeno (FBN) por aquellas bacterias capaces de realizarla, ya que este ambiente es pobre en oxígeno y relativamente rico en fuentes de carbono (James, 2000; James y Olivares, 1998; Sprent y James, 1995). En el caso de las bacterias diazotrofas endófitas podrían fijar el  $N_2$  y liberarlo directamente en el interior de las plantas (Döbereiner *et al.*, 1993) contribuyendo con un aporte importante a los requerimientos nitrogenados vegetales (Boddey *et al.*, 1995). El descubrimiento de bacterias endófitas con capacidad de fijar  $N_2$ , tal como *G. diazotrophicus*, ha abierto un nuevo capítulo en la investigación sobre la FBN y las interacciones planta-microorganismo, principalmente en plantas no leguminosas debido al potencial agrobiotecnológico que este tipo de relaciones simbióticas representa. La colonización de la caña de azúcar por *G. diazotrophicus* representa un sistema modelo para la asociación benéfica entre una planta y una especie bacteriana diazotrófica de hábitat endófito derivado de la capacidad de fijar  $N_2$  en presencia de nitratos (Cavalcante y Döbereiner, 1988) y el excelente crecimiento de *G. diazotrophicus* en condiciones *in vitro* similares a las presentes en la caña de azúcar (Boddey *et al.*, 1991).

*G. diazotrophicus* tiene la capacidad de reducir  $N_2$  a  $NH_4^+$  tanto en vida libre bajo condiciones de microaerofilia como en el interior de la planta hospedadora (Boddey, 1995), lo que le permite crecer en medios carentes de aminoácidos ó sales de amonio. Debido a la ausencia de una nitrato reductasa no consume nitratos. Es capaz de crecer y fijar  $N_2$  a valores de pH entre 2,5 y 7,0 (Stephan *et al.*, 1991; Luna y Boiardi, 2008). Algunas condiciones ambientales como la concentración de  $O_2$  y la presencia de sales de amonio pueden afectar la capacidad de fijar  $N_2$  inhibiendo la nitrogenasa. Para *G. diazotrophicus*, la concentración de  $O_2$  a la cual ocurre una disminución en la actividad nitrogenasa se incrementa de 2 KPa en 1,0 % p/v de glucosa, a 4 KPa (0,4 atm) en 10,0 % p/v de sacarosa (Reis y Döbereiner, 1998). La fijación de nitrógeno es sólo inhibida parcialmente por la adición de  $(NH_4)_2SO_4$  2,65 g/l y varios aminoácidos que muestran un efecto similar en presencia de 5 g/l de glucosa (Stephan *et al.*, 1991). Con niveles de 0,26; 0,66 y 1,32 g/l de  $(NH_4)_2SO_4$ , en presencia de 1,0 % p/v de sacarosa, la actividad nitrogenasa es inhibida parcialmente pero las células mantienen su actividad si la concentración de sacarosa es de un 10 % p/v (Reis y Döbereiner, 1998). En el caso de

nitrógeno combinado, la protección podría ser explicada por la baja asimilación de amonio que manifiestan las células de *G. diazotrophicus* cuando crecen con 10 % p/v de sacarosa. Este mecanismo resulta de gran interés considerando el hábitat de *G. diazotrophicus*, normalmente rico en sacarosa, por lo que su nitrogenasa podría estar activa aún cuando la bacteria se encuentre en un ambiente rico en amonio (Reis y Döbereiner, 1998). La FBN no es afectada en presencia de 10 mM de  $\text{NO}^{-3}$  (Stephan *et al.*, 1991; Li y MacRae, 1991).

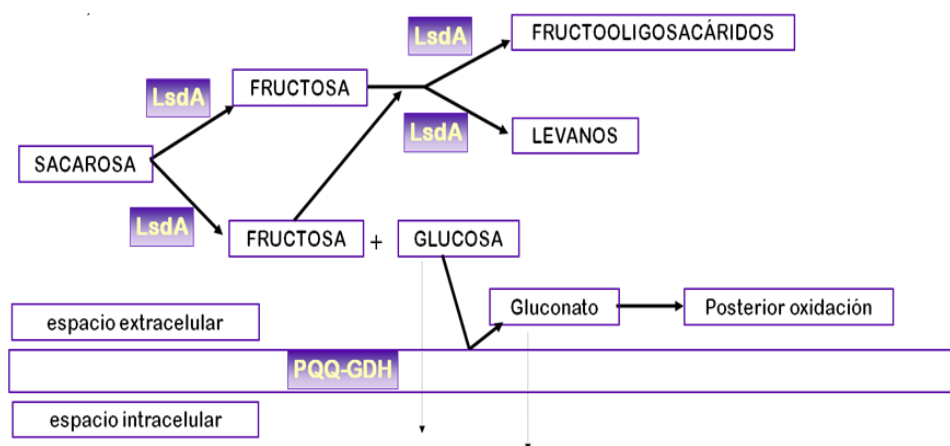
La bacteria utiliza la enzima glutamato deshidrogenasa (EC 1.4.1.4) para metabolizar las sales de  $\text{NH}_4^+$  cuando estas son agregadas al medio de cultivo. Sin embargo, en condiciones de fijación de  $\text{N}_2$  la asimilación del  $\text{NH}_4^+$  sintetizado, ocurre fundamentalmente a través de la acción de las enzimas glutamina sintetasa (EC 6.3.1.2) y glutamato sintetasa (EC 2.6.1.53), proceso de alta demanda energética. Este comportamiento alternativo es común en bacterias fijadoras de  $\text{N}_2$  (Alvarez y Martínez-Dretz, 1995).

En estudios realizados por Sevilla *et al.* (2001), sobre el mecanismo de la fijación de  $\text{N}_2$ , se han caracterizado las enzimas y los genes responsables de la fijación de  $\text{N}_2$  amplificándose los genes *nif* y otros genes regulatorios en *G. diazotrophicus*. Otros estudios revelaron la localización cromosomal del gen *nifA* y su sensibilidad a  $\text{O}_2$  y  $\text{NH}_4^+$ , similar a lo encontrado en otros fijadores de nitrógeno (Lee *et al.*, 2000 y Teixeira *et al.*, 1999).

### 1.2.3. Metabolismo de carbono

*G. diazotrophicus* crece bien en medios de cultivos que contengan sacarosa, glucosa, fructosa, gluconato, manitol, sorbitol o glicerol como única fuente de carbono (Gillis *et al.*, 1989; Stephan *et al.*, 1991; Ureta *et al.*, 1995). En cambio, no puede utilizar los ácidos dicarboxílicos como succinato, fumarato o malato, aspecto que diferencia a esta especie de otras bacterias diazotróficas (Alvarez y Martínez-Dretz, 1995). Ésta incapacidad de utilizar ácidos dicarboxílicos como fuente de carbono y energía, se debe a la ausencia de un sistema de transporte que los internalice, y no a una pérdida de las enzimas que los catabolizan, ya que Alvarez y Martínez-Dretz (1995) determinaron la presencia de las mismas en extractos celulares de cultivos de *G. diazotrophicus*.

No crece en presencia de disacáridos como lactosa, melobiosa, celobiosa y maltosa (Ureta *et al.*, 1995). Sin embargo, la sacarosa constituye la fundamental fuente de carbono de la cual la bacteria dispone en su principal hábitat natural, el apoplasma de la caña de azúcar (Dong *et al.*, 1994; 1995). Paradójicamente la especie *G. diazotrophicus* carece de un sistema de transporte de la sacarosa hacia el interior celular, por lo que su crecimiento a expensas de esta fuente de carbono fue atribuido al consumo de la glucosa y/o la fructosa liberadas por la acción de una o varias enzimas extracelulares con actividad sacarolítica (Alvarez y Martínez-Dretz, 1995). En condiciones de vida libre, *G. diazotrophicus* tolera presiones osmóticas de hasta 300 g/l de sacarosa en medio semisólido y su crecimiento es óptimo a concentraciones de 100 g/l del disacárido (Gillis *et al.*, 1989).



**Figura 3:** Esquema simplificado del metabolismo de *Gluconacetobacter diazotrophicus* creciendo en sacarosa.

Como ya se mencionó el metabolismo de la sacarosa en *G. diazotrophicus* implica como primer paso la hidrólisis del disacárido mediante la acción de enzimas extracelulares (figura 3), dada la carencia de un sistema de transporte de este azúcar hacia el interior celular (Alvarez y Martínez-Dretz, 1995). *G. diazotrophicus* es capaz de producir y secretar una proteína con actividad levansacarasa (LsdA, sacarosa 6-fructosiltransferasa, EC. 2.4.1.10), la cual se expresa en forma constitutiva (Hernández *et al.*, 1995; 2000). Ésta enzima hidroliza la sacarosa y transfiere el residuo fructosilo a otra sacarosa para formar fructanos intermediarios que luego se polimerizan produciendo fructooligosacáridos y levanos de alto peso molecular (Cote y Ahlgran, 1993), mientras que la glucosa es catabolizada por el microorganismo.

Se conoce que las bacterias acéticas tienen la capacidad de formar ácidos por incompleta oxidación de azúcares o alcoholes y excretar los mismos, transitoriamente o como productos finales no utilizables. Aldehídos, aldosas y cetosas son oxidados a sus respectivos ácidos, como ser:

glucosa → gluconato

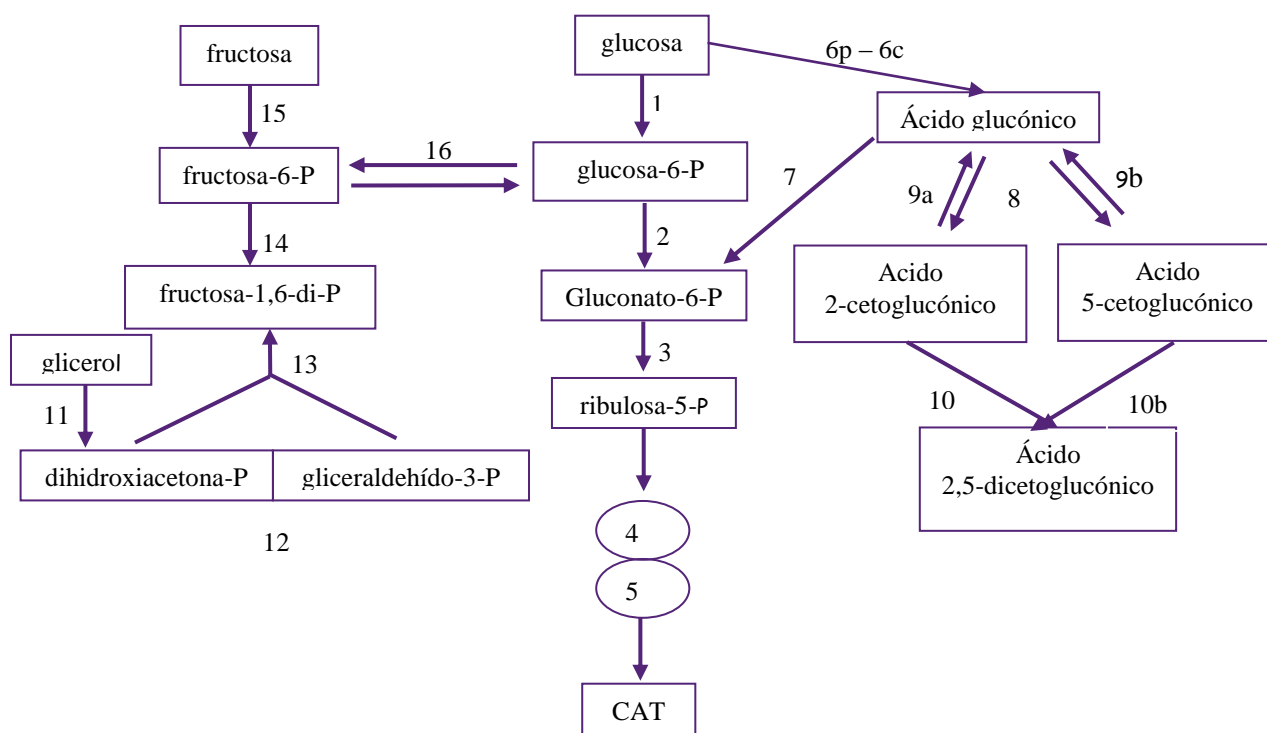
gluconato → cetogluconatos

glicolaldehído → glicolato

xilosa → xilonato

Particularmente para la glucosa, en bacterias Gram (-), el primer paso en el metabolismo puede ser la oxidación directa a ácido glucónico (Lessie y Phibbs, 1984). Posteriormente el ácido glucónico producido puede ser fosforilado y metabolizado vía la ruta de las pentosas fosfatos ó la ruta de Entner-Doudoroff. En algunos casos, este ácido puede ser oxidado periplasmáticamente a 2-cetogluconato vía gluconato deshidrogenasa FAD-dependiente (EC. 1.1.99.3) y luego transformarse en el interior de la célula (por la acción de una ó más enzimas) en 6-fosfogluconato e incorporarse en algunas de las rutas citadas anteriormente. Alternativamente, la glucosa puede ser fosforilada previa a su oxidación. La glucosa 6-fosfato formada en ésta última reacción puede ser metabolizada a través de tres rutas diferentes: la ruta de Embden-Meyerhof-Parnas ó glicólisis, la ruta de las pentosas fosfato y la ruta de Entner-Doudoroff.

Análisis de actividades enzimáticas claves de las rutas metabólicas en *G. diazotrophicus*, sugieren que el metabolismo de la glucosa procede exclusivamente vía la ruta de las pentosas fosfatos ya que las enzimas claves de las rutas de Embden-Meyerhof-Parnas (6-fosfofructoquinasa y 1-fosfofructoquinasa) y Entner-Doudoroff (6-fosfogluconato deshidratasa y 2-ceto-3-deoxifosfogluconato aldolasa) no han sido detectadas (Alvarez y Martínez-Dretz, 1995; Attwood *et al.*, 1991; Luna *et al.*, 2006). Posteriormente, la oxidación completa de la fuente de carbono ocurre a través del ciclo de los ácidos tricarbónicos (Alvarez y Martínez-Dretz, 1995). No obstante, tanto la ruta fosforilativa como la de oxidación de la glucosa a través de una glucosa deshidrogenasa NAD-dependiente soluble (EC. 1.1.1.47) (sGDH) parecen ser operativas (Alvarez y Martínez-Dretz, 1995; Attwood *et al.*, 1991; Luna *et al.*, 2002; 2006), sin embargo se ha informado que la oxidación periplasmática de la glucosa en *G. diazotrophicus* juega un rol muy importante en el primer paso del metabolismo de este hidrato de carbono (Stephan *et al.*, 1991; Attwood *et al.*, 1991; Luna *et al.*, 2002; 2006).

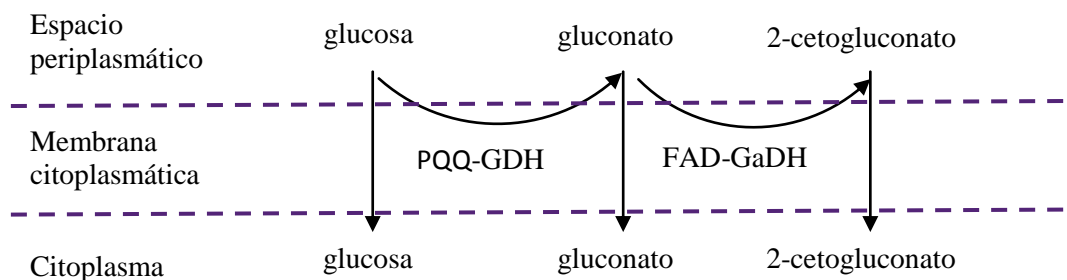


**Figura 4:** Posibles rutas metabólicas para la reducción de los hidratos de carbono en *Gluconacetobacter diazotrophicus*. CAT: Ciclo de los Ácidos Tricarboxílicos. Los números se refieren a las enzimas citadas a continuación. 1: glucoquinasa; 2: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (NAD-NADP); 3: 6-fosfogluconato deshidrogenasa-NAD; 4: transcetolasa; 5: transaldolasa; 6: p-glucosa deshidrogenasa-DCIP; 6c: glucosa deshidrogenasa-NAD; 7: gluconatoquinasa; 8: gluconato deshidrogenasa (DCIP-NAD-NADP); 9a: 2-cetogluconato reductasa-NAD; 9b: 5-cetogluconatoreductasa-NADP; 10a: 2-cetogluconato deshidrogenasa-DCIP; 10b: 5-cetogluconato deshidrogenasa-DCIP; 11: glicerol-fosfato deshidrogenasa; 12: triosafosfato isómerasa; 13: fructosa difosfato aldolasa; 14: fructosa difosfatasa; 15: fructoquinasa; 16: glucosa-6-fosfato isómerasa.

En el camino de dilucidar la ruta catabólica de la glucosa en *G. diazotrophicus*, Alvarez y Martínez-Dretz (1995) sugieren que *G. diazotrophicus* emplea glucosa, fructosa, ácido glucónico y glicerol, según las secuencias catabólicas que se muestran en la figura 4.

Posteriormente Boiardi y Galar (1996) dieron a conocer la expresión de una enzima periplasmática en *G. diazotrophicus* denominada glucosa deshidrogenasa pirrolo-quinolina quinona (PQQ) dependiente (GDH-PQQ, EC 1.1.99.17) junto con una gluconato deshidrogenasa de membrana (GaDH) constituyen la ruta de oxidación directa de la glucosa en *G. diazotrophicus* (figura 5). Ésta oxidación de glucosa a gluconato es una fuente rápida de energía metabólicamente utilizable y es de esta forma que se propone esta vía como la principal ruta del catabolismo de aldosas en este

microorganismo (Attwood *et al.*, 1991; Galar y Boiardi, 1996). Es preciso mencionar que la FBN es un proceso que impone una elevada exigencia energética celular, de manera que esta ruta de provisión de energía podría jugar un rol muy importante en microorganismos que sean capaces de fijar  $N_2$ .

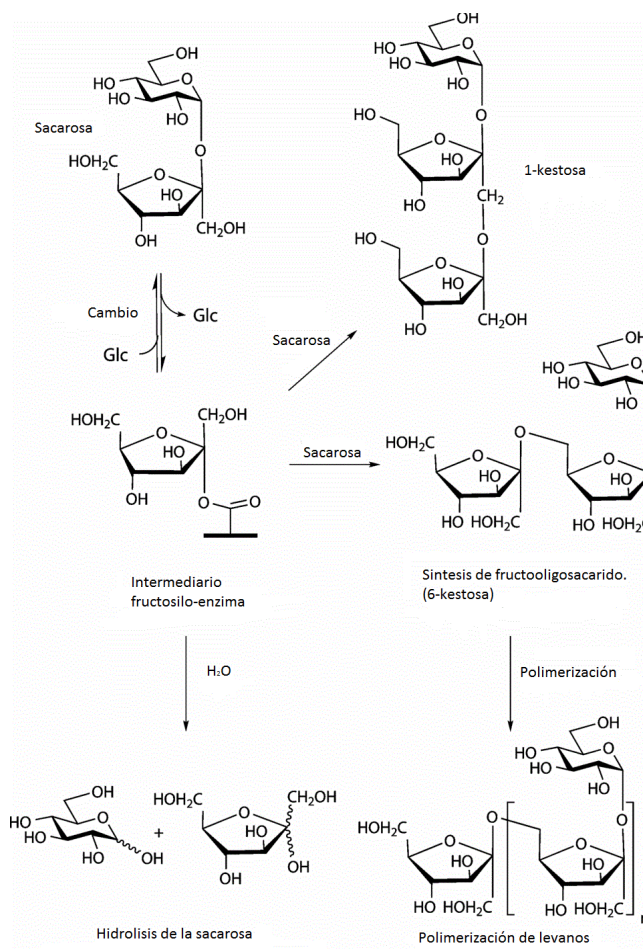


**Figura 5.** Ruta de oxidación directa de la glucosa en *G. diazotrophicus*.

#### 1.2.4. Levansacarasa

La levansacarasa de *G. diazotrophicus* (LsdA) ha sido purificada y caracterizada desde el sobrenadante de cultivos de la cepa PAL5 por Hernández *et al.* (1995). La enzima es constituida por una única cadena polipeptídica de 60,4 kDa y pI 5,5; su actividad polimerasa es máxima a 30-40 °C y pH 5,0-5,5. LsdA cataliza la transferencia del residuo fructosilo de la sacarosa a las moléculas aceptoras (agua, sacarosa, levano o glucosa), mediante un mecanismo cinético de doble desplazamiento que involucra la formación de un intermediario transitorio enzima-fructosilo (EF) (figura 6).

Los valores de las constantes cinéticas de los pasos de la formación del complejo EF, fueron similares a los encontrados para las levansacarases de *Bacillus subtilis* y *Streptococcus salivarius* (Hernández *et al.*, 1995). Estas enzimas, sin embargo, mostraron diferencias en cuanto a la especificidad por el substrato aceptor del residuo fructosilo. LsdA tiene la particularidad de producir y acumular altos niveles de los fructooligosacáridos (FOS) 1-kestosa y nistosa, compuestos de elevado interés comercial. La polimerización de la sacarosa *in vivo* resultó en la síntesis de largas cadenas de levanos, con masa molecular superior a  $2 \times 10^6$  Da. (Hernández *et al.*, 1995).



**Figura 6:** Pasos catalizados por LsdA a partir de sacarosa como sustrato.

Todas las levansacarinas conocidas son proteínas extracelulares, aunque existen diferentes rutas de secreción. La secreción de las levansacarinas en bacterias Gram (+) involucran el clivaje de un péptido señal del precursor de la proteína. Ejemplos de este sistema son las levansacarinas de *Bacillus subtilis* (Steinmetz *et al.*, 1985), *Bacillus amyloliquefaciens* (Tang *et al.*, 1990), *Geobacillus stearothermophilus* (Li *et al.*, 1997), *Paenibacillus polymyxa* (Bezzate *et al.*, 2000), *Streptococcus salivarius* (Rathsam *et al.*, 1993), entre otras (Bergeron *et al.*, 2000; Saito *et al.*, 1997; van Hijum *et al.*, 2004). Sin embargo, con la excepción de LsdA, otras levansacarinas caracterizadas hasta el momento en bacterias Gram (-) son secretadas por una vía independiente de péptido señal, esto ocurre en *Zymomonas mobilis* (Song *et al.*, 1993), *Erwinia amylovora* (Geier y Geider, 1993), *Bahnella aquatilis* (Song *et al.*, 1998), *Pseudomonas syringae* (Hettwer *et al.*, 1998, Li y Ullrich 2001) y *Gluconacetobacter xylinus* (Tajima *et al.*, 2000). En *G. diazotrophicus*, LsdA es sintetizada como una proteína precursora de 584

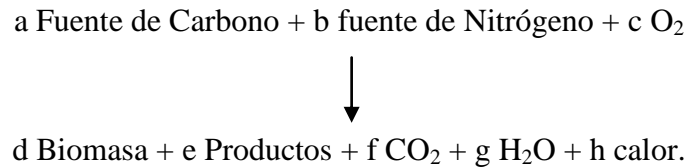


aminoácidos con un péptido señal N-terminal de 30 residuos que es hidrolizado en el espacio periplasmático durante la secreción. Este proceso proteolítico es seguido de la formación de un ciclo en el residuo Gln31, provocando el bloqueo total del extremo N de la proteína madura y proporcionándole su conformación final. Por lo cual este es un paso relativamente limitante en la maduración de LsdA. Una vez concluido este paso, la enzima madura es transferida a través de la membrana externa y se libera al espacio extracelular por medio de un sistema de secreción tipo II (Arrieta *et al.*, 2004). Este sistema de secreción, en *G. diazotrophicus* está genéticamente controlado por un operón de transcripción constitutiva lo cual es lógico ya que el sustrato de este sistema es una enzima (LsdA) de expresión constitutiva también (Hernández *et al.*, 1995).

Estudios de RFLP revelaron que el gen *lsdA* constituye un locus cromosómico de copia única y escaso grado de polimorfismo entre poblaciones de *G. diazotrophicus* provenientes de diferentes hospederos y regiones geográficas distantes. La mutación de este gen en cuatro genotipos representativos de la especie provocó la inactivación total de la actividad levansacarasa y en consecuencia, las bacterias mutadas perdieron la capacidad de utilizar la sacarosa como fuente de carbono (Hernández *et al.*, 1999).

### 1.3. Sistema de cultivo

Teniendo en cuenta el principio de conservación de la materia y tomando al crecimiento bacteriano en un biorreactor como una ecuación química, donde los componentes del medio de cultivo son los reactivos y la biomasa y otras sustancias liberadas al exterior celular son los productos, se puede escribir:



Donde a, b, c, d, d, e, f, g y h son los coeficientes estequiométricos y la formula mínima promedio de la biomasa se establece como  $\text{CH}_{1.8}\text{O}_{0.5}\text{N}_{0.2}$ . Cabe mencionar que el  $\text{O}_2$  se considera un reactivo sólo para el crecimiento de bacterias aeróbicas.

Así se puede establecer la estequiometría del crecimiento microbiano por el cual la concentración final de microorganismos obtenidos dependerá de la concentración y composición del medio de cultivo. Determinados los coeficientes estequiométricos del crecimiento microbiano y teniendo en cuenta parámetros cinéticos detallando las velocidades de la reacción, se puede conocer la velocidad de crecimiento del microorganismo y la formación de producto.

La aplicación de la estequiometría requiere conocer los rendimientos, definidos éstos como la relación entre el producto obtenido y el sustrato consumido, expresado matemáticamente para la biomasa como:

$$Y_{x/s} = -\frac{dX}{dS}$$

Siendo:

$Y_{x/s}$ : el rendimiento celular por un determinado nutriente.

$dX/dS$ : la cantidad de biomasa generada al consumirse el nutriente.

La misma relación se puede plantear para la formación de producto.

$$Y_{P/S} = - \frac{dP}{dS}$$

Para el caso del cálculo de los parámetros cinéticos se debe tener en cuenta la naturaleza auto-catalítica del crecimiento microbiano, donde es lógico suponer que la concentración de microorganismos,  $X$ , influye en la velocidad con que aumenta la población,  $r_X$  (velocidad de formación de biomasa), así:

$$r_X = \mu X$$

En esta ecuación,  $\mu$  es la velocidad específica de crecimiento, la cual depende del microorganismo, de la composición del medio de cultivo, la presencia de inhibidores, temperatura y pH. Aunque Existen varias expresiones para  $\mu$ , la más difundida y utilizada es la ecuación de Monod (1949) que establece:

$$\mu = \frac{\mu_{m\acute{a}x} S}{K_S + S}$$

Siendo:

$S$ : la concentración del sustrato limitante.

$K_S$ : la constante de afinidad para el sustrato limitante.

Para el caso de la velocidad de consumo de sustrato se puede establecer la siguiente expresión matemática

$$r_S = q_S X$$

donde:

$r_S$ : es la velocidad de consume de sustrato

$q_S$ : es la velocidad específica de consumo de sustrato, que también se puede obtener de:

$$q_s = \frac{\mu}{Y_{X/S}}$$

Para el caso de las bacterias aeróbicas, el O<sub>2</sub> se toma como un requerimiento nutricional necesario para el crecimiento bacteriano. Determinado los parámetros cinéticos del consumo de este nutriente y de la producción de CO<sub>2</sub> se puede comprender los requerimientos metabólicos del microorganismo para este nutriente, principal limitante del crecimiento bacteriano en aquellos cultivos con insuficiente aeración. Para poder conocer estas velocidades se plantean las siguientes expresiones matemáticas:

$$r_{O_2} = \frac{0,79 F_1 T_{CNTP} P_t}{V T_t P_{CNTP}} \frac{(X_{O_2})_2}{1 - (X_{O_2})_2 - (X_{CO_2})_2} - \frac{(X_{O_2})_1}{0,79}$$

$$r_{CO_2} = \frac{0,79 F_1 T_{CNTP} P_t}{V T_t P_{CNTP}} \left( \frac{(X_{CO_2})_2}{1 - (X_{O_2})_2 - (X_{CO_2})_2} \right)$$

F: flujo de aire

Pt: presión de trabajo

V: volumen de cultivo

Tt: temperatura de trabajo

X<sub>O<sub>2</sub></sub>: fracción molar de O<sub>2</sub> en el aire

X<sub>CO<sub>2</sub></sub>: fracción molar de CO<sub>2</sub> en el aire

subíndice 1: aire que ingresa al biorreactor

subíndice 2: aire a la salida del biorreactor

Resumiendo, para un componente cualquiera del cultivo, incluida la biomasa se puede plantear el siguiente balance de materia dentro del biorreactor:

Velocidad de acumulación = velocidad de ingreso – velocidad de salida + velocidad de formación – velocidad de consumo.

$$\frac{d(VC_i)}{dt} = F_1 C_1 - F_2 C_2 + V r_{f_i} - V r_{c_i}$$

Donde:  $V$  es el volumen de cultivo,  $F_1$  es el caudal de alimentación,  $F_2$  es el caudal de salida,  $C_{i1}$  es la concentración del componente “i” en la alimentación y  $C_{i2}$  es la concentración de “i” en el caudal de salida, la cual suponiendo una condición de mezclado perfecto, se asume idéntica a la que hay dentro del biorreactor. Los términos  $r_{fi}$  y  $r_{ci}$  se refieren a la velocidad de formación y consumo del componente “i” respectivamente.

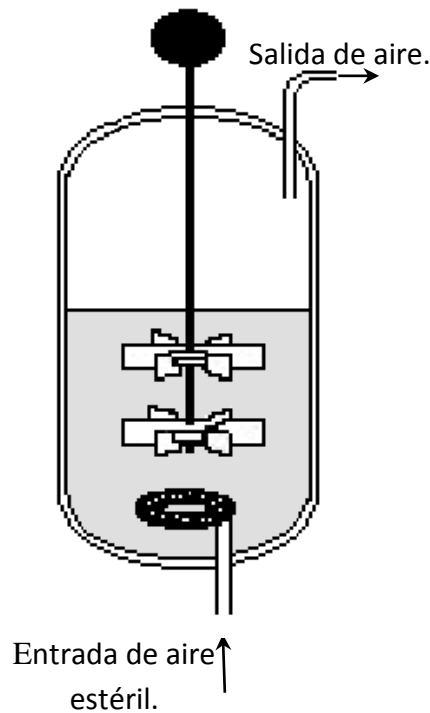
### 1.3.1. Cultivo batch

Los cultivos “batch”, ó cultivos discontinuos, son sistemas cerrados que contienen todos los nutrientes necesarios para cumplir con las necesidades fisiológicas y nutricionales del organismo, en este sistema  $F_1$  y  $F_2$  son iguales a 0 presentándose una dependencia directa entre la variación de los nutrientes en el tiempo y la velocidad de consumo de estos, lo que se puede expresar matemáticamente como

$$\frac{dC_i}{dt} = r_{fi} - r_{ci}$$

Como se muestra en la figura 7, el cultivo batch es un cultivo abierto para los componentes gaseosos como el  $O_2$  si estamos en condiciones aeróbicas. En el caso de las concentraciones de nutrientes en el medio líquido uno de los componentes se encuentra estequiometricamente en defecto con respecto a los otros por lo cual se lo denomina “nutriente limitante del crecimiento”. Mediante la ecuación de Monod descrita anteriormente vemos que mientras el sustrato limitante esté presente en el medio de cultivo la velocidad específica de crecimiento es máxima ( $\mu_{m\acute{a}x}$ , fase exponencial)

En este sistema de cultivo, los microorganismos producen cambios continuos e incontrolables en su medio ambiente; la concentración bacteriana se eleva, la de sustrato disminuye y aparecen productos con concentraciones variables. Los microorganismos se adaptan a esas condiciones modificando su fenotipo, lo cual a menudo se traduce en una alteración de la velocidad de crecimiento generando un efecto sobre la fisiología del microorganismo.



**Figura 7:** Esquema de un biorreactor funcionando en “batch”.

Matemáticamente se puede establecer las siguientes relaciones propias de un cultivo batch, para poder entender su comportamiento y predecir los parámetros biotecnológicos necesarios para caracterizar el sistema productivo.

Las velocidades específicas de producción de biomasa ( $\mu$ ), de consumo de sustrato ( $q_s$ ), de consumo de  $O_2$  ( $q_{O_2}$ ) y de producción de  $CO_2$  ( $q_{CO_2}$ ), se derivan de los pesos secos ( $x$ ) de biomasa, de las concentraciones de sustratos ( $S$ ) y productos medidos en los sobrenadantes de los cultivos y de las velocidades de consumo y producción de  $O_2$  y  $CO_2$  respectivamente. El valor de  $\mu_{m\acute{a}x}$  se puede obtener de la pendiente de la curva  $\ln DO$  en función del tiempo ( $t$ ), según la siguiente ecuación que es válida sólo en la etapa de crecimiento logarítmico:

$$\ln DO = \ln(DO)_0 + \mu_{m\acute{a}x} t$$

$DO_0$ : densidad óptica proporcional a la concentración de biomasa inicial.

$DO$ .: densidad óptica al tiempo  $t$ .

Los valores de  $q_s$  se determinan empleando la siguiente expresión:

$$q_s = \frac{r_s}{X}$$

$r_s$ : velocidad volumétrica de consumo de sustrato (ds/dt).

$X$ : concentración de biomasa a tiempo  $t$ .

Los valores de  $r_s$  se pueden obtener de la pendiente de la curva  $S$  en función del tiempo, Las velocidades de consumo de  $O_2$  y de producción de  $CO_2$  se calculan siguiendo las ecuaciones descriptas anteriormente. Pero las velocidades específicas de consumo y producción de  $O_2$  y  $CO_2$ , se calcularon de acuerdo a las siguientes expresiones:

$$q_{O_2} = \frac{r_{O_2}}{X} \qquad q_{CO_2} = \frac{r_{CO_2}}{X}$$

Los rendimientos en biomasa respecto al sustrato  $S$  (en general la fuente de carbono y energía) se calculan según los pesos secos de biomasa y de la concentración del sustrato  $S$  medido en el sobrenadante, según la siguiente expresión:

$$Y_{X/S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S}$$

Sin embargo existe la posibilidad de calcular un rendimiento máximo teórico de biomasa según el grado de reducción de los nutrientes frente al grado de reducción de la biomasa, entendiendo el concepto de grado de reducción ( $\gamma$ ) como los electrones que 1 C-mol de cada nutriente es capaz de entregar para realizar la reducción del  $O_2$  según el estado de referencia que se tenga en cuenta (Ertola *et al.*, 1994). Teniendo en cuenta que el C-mol se define como la cantidad de compuesto que contiene un átomo gramo de carbono, se plantea la siguiente ecuación para el cálculo de dicho parámetro según la formula de 1 C-mol de compuesto y considerando como referencia al  $N_2$ .

Formula mínima de 1 C-mol de compuesto:  $CH_aO_bN_c$

$$\gamma^{N_2} = 4 + a - 2b$$

En efecto, si se considera un grado de referencia diferente como el  $\text{NH}_4^+$  este parámetro se ve modificado. A lo largo de este trabajo, se ha considerado al  $\text{N}_2$  como estado de referencia para los cálculos donde este parámetro fue involucrado.

Habiendo introducido el concepto de grado de reducción, el rendimiento máximo teórico de obtención de biomasa toma la siguiente forma matemática:

$$y_{x/s}^{\text{teorico}} = \frac{\gamma_s^{\text{N}_2}}{\gamma_x^{\text{N}_2}}$$

Es preciso aclarar que este rendimiento teórico de formación de biomasa considera la total conversión de la fuente de carbono en energía en biomasa, desechando la posibilidad de la producción de otro tipo de productos a partir de dicha fuente como la producción de  $\text{CO}_2$  a partir de la respiración celular. Por ende, este parámetro sobredimensiona el rendimiento de biomasa, sin embargo es una buena aproximación del máximo rendimiento obtenible.

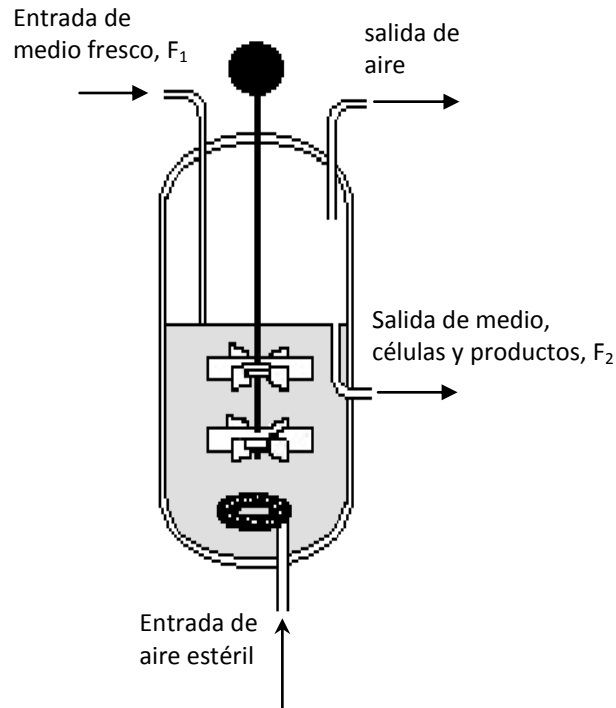
### 1.3.2. Cultivo continuo

Todo cultivo continuo (CC) se inicia con un cultivo “batch” que en fase exponencial comienza a ser alimentado continuamente con medio fresco a una velocidad constante (F) de manera que el crecimiento microbiano continúe indefinidamente en el tiempo. En el biorreactor el volumen de medio (V) se mantiene constante por continua remoción de cultivo por medio de un rebase a igual caudal que el de la alimentación, este efluente del reactor contiene células, productos de la actividad metabólica del microorganismo y el medio agotado. Así y refiriéndonos al balance de materia dentro del biorreactor, F1 y F2 son distintos a 0 y poseen el mismo valor (figura 8). Presentándose la siguiente expresión matemática:

$$V \frac{dC_i}{dt} = F(C_1 - C_2) + V(r_{f_i} - r_{c_i})$$



En las condiciones de “estado estacionario” (EE) las concentraciones de biomasa, sustratos y productos dentro del biorreactor permanecen constantes en el tiempo, lo que significa igualar a cero la ecuación anterior.



**Figura 8:** Esquema de un reactor funcionando en cultivo continuo.

Planteándose el balance para la biomasa ( $X$ ), resulta que el valor de la velocidad de dilución  $D$  (definido como  $D = F/V$ ), es igual a la velocidad específica de crecimiento,  $\mu$ , del microorganismo.

$$r_{fX} = D(X_2 - X_1) = \mu X_{EE}$$

De esta forma en un CC se puede imponer el valor de  $\mu$  que uno desee mientras sea menor que el  $\mu_{\text{máx}}$  del cultivo “batch” del microorganismo crecido en iguales condiciones nutricionales. En el caso de que esta velocidad de dilución sea mayor que la velocidad de duplicación del microorganismo el cultivo se lava, resultado en la eliminación de los organismos dentro del biorreactor.

Si el balance de masa se plantea para algún sustrato ( $S$ ) ó para algún producto ( $P$ ), resultan las ecuaciones;

$$r_{cS} = D(S_1 - S_2) = \mu(S_R - S_{EE})$$

Con  $S_{EE}$ : 0 si se trata del sustrato limitante del crecimiento.

$S_R$ : concentración del sustrato en el reservorio de alimentación.

$$r_{cS} = D(P_2 - P_1) = \mu P_{EE}$$

Teniendo en cuenta que las concentraciones de sustratos y productos en el estado estacionario no sólo dependen de la actividad específica celular sino también de la concentración de biomasa en el reactor, es fisiológicamente más relevante considerar velocidades específicas de producción y de consumo, antes que velocidades volumétricas, para poder comparar los distintos estados estacionarios definidos estos en diferentes condiciones nutricionales y/o ambientales. Así las velocidades específicas ya se han definido como velocidades volumétricas por unidad de biomasa y las velocidades volumétricas en cultivo continuo están dadas por los valores de  $r_{fX}$ ,  $r_{fP}$ ,  $r_{cS}$  descriptos anteriormente. Las velocidades de consumo de  $O_2$  y de producción de  $CO_2$  se calculan de la misma manera que para un cultivo “batch”.

El C-mol se define como la cantidad de compuesto que contiene un átomo gramo de Carbono, así todos los coeficientes estequiométricos expresados en la ecuación de balance de materia quedan expresados en C-mol por C-mol de fuente de carbono y energía. Tanto el parámetro  $b$  como los rendimientos fueron calculados como cocientes de velocidades específicas según las ecuaciones.

$$Y_{X/S} = \frac{\mu}{q_S}$$

$$Y_{CO_2/S} = \frac{q_{CO_2}}{q_S}$$

$$Y_{O_2/S} = b = \frac{q_{O_2}}{q_S}$$

$$Y_{P/S} = \frac{q_P}{q_S}$$

Los balances de carbono y de grado de reducción fueron calculados de acuerdo a Roels (1983).

Balance ó Recuperación de Carbono (B.C.):

$$Y_{X/S} + Y_{CO_2/S} + Y_{P/S} = 1$$

Balance ó Recuperación de energía ó de grados de reducción:

$$4b + Y_{X/S}\gamma_S + Y_{P/S}\gamma_P = \gamma_S$$

El grado de reducción de un compuesto ( $\gamma$ ) definido como el número de electrones que 1 C-mol de dicho compuesto puede ceder al oxígeno.

### 1.3.3. Cultivos “batch” vs. Cultivos Continuos

En un cultivo “batch”, tal como se describió y mostró anteriormente, el ambiente sufre cambios continuos e incontrolados, a los cuales los microorganismos se deben adaptar modificando su fenotipo. Así, en cultivos “batch” es difícil separa la respuesta fisiológica del microorganismos y la modificaciones inherentes a este sistema de cultivo para estudiar la respuesta fisiológica bacteriana frente a la alteración de una condición definida del cultivo.

Un ambiente de crecimiento constante en el tiempo, reproducible y bien definido puede ser creado empleando la técnica de cultivos continuos (Herbert *et al.* 1958, 1965; Tempest 1970, Hoskisson 2005). En este tipo de cultivo es posible estudiar la influencia de una única variable ambiental o nutricional sobre la fisiología y el metabolismo de un microorganismo, mientras el resto de las condiciones permanecen constantes. El crecimiento en un reactor ocurre bajo limitación por algún nutriente, que afecta fuertemente la eficiencia de producción de biomasa. La utilización más eficiente de la fuente de carbono ha sido invariablemente encontrada bajo condiciones de limitación

por carbono. Bajo estas condiciones la fuente de carbono es utilizada sólo para producción de energía y síntesis de biomasa no detectándose, generalmente, otros productos en los cultivos. En contraste, la adaptación a un exceso de la fuente de carbono involucra la activación de mecanismos que incrementan la capacidad de asimilación del sustrato limitante. Esta adaptación metabólica es acompañada por un gasto de energía mostrándose un aumento en la velocidad de catabolismo de la fuente de carbono y donde se observa un desacoplamiento entre el catabolismo y anabolismo. En muchas especies de microorganismos este desacople se traduce en la excreción de intermediarios del metabolismo parcialmente oxidados que son denominados por algunos autores como “metabolitos de sobreflujo” (Neijssel y Tempest, 1979).

## 1.4. Proteómica.

### 1.4.1. Electroforesis bidimensional (2-DE)

La electroforesis bidimensional (2-DE) es una poderosa herramienta para el análisis proteómico. Esta técnica consiste en la separación de proteínas primero según la carga eléctrica neta (IEF) de las proteínas y luego por la masa (SDS) de éstas macromoléculas, lo cual provee del mapa proteico expresado en las células bacterianas en un momento determinado, dando a conocer información importante sobre la fisiología y el metabolismo de los microorganismos de relevancia industrial. En el caso de las bacterias productoras de polisacáridos, existe un problema adicional al realizar el análisis proteico, ya que la existencia de polisacáridos de alto peso molecular obstruye los poros de los geles de la primer dimensión, generando un impedimento en la movilidad de las proteínas sobre el gradiente de pH provisto en el soporte del isoelectroenfoco (Polati *et al.* 2009). En este caso, lo primero que se debe evaluar es la adecuada manipulación y generación de la muestra proteica a ser analizada.

El genoma de *G. diazotrophicus* ya se encuentra disponible en banco de datos público (número de acceso NC 010125). Del total de 3778 ORFs anotados aproximadamente el 23% corresponde a proteínas de funciones desconocidas. Alguno de los restantes ORFs, fueron clasificados preliminarmente pero falta la confirmación definitiva de su función.

Las proteínas participan en todos los procesos celulares, algunos de los cuales ocurren a nivel citoplasmático, otros en el periplasma y otros extracelularmente. Las bacterias Gram(-) son capaces de producir y secretar al medio extracelular una amplia diversidad de proteínas. Algunas de las cuales presentan diversas funciones ya descritas en *G. diazotrophicus* tales como: bacteriocinas, proteasas, hidrolasas, factores de resistencia múltiple a drogas (Piñón *et al.* 2002, Martínez-Fleites *et al.* 2005, Le Roy *et al.*, 2007).

La hidrólisis de polisacáridos y de otras macromoléculas, así como la oxidación de glucosa a ácido glucónico y cetoglucónico, son un claro ejemplo de procesos metabólicos esenciales para *G. diazotrophicus* que ocurren tanto a nivel extracelular como asociados a la membrana de este microorganismo, otras proteínas también actúan tanto en el proceso anabólico como en el catabolismo de carbohidratos promoviendo, respuestas antagónicas hacia otros organismos, además de otras funciones aún

desconocidas (Piñón *et al.* 2002, Martínez-Fleites *et al.* 2005, Le Roy *et al.* 2007, Blanco *et al.* 2005, Muñoz-Rojas *et al.* 2005). Claros ejemplos de esto último son las proteínas pertenecientes a la familia de transportadores ABC, ya caracterizadas en *G. diazotrophicus*; y otras proteínas secretadas al medio de cultivo asociadas a la interacción de este microorganismo con la planta huésped (Bertalan *et al.*, 2009).

A partir del estudio exploratorio del perfil proteico expresado en células de *G. diazotrophicus* fueron identificadas 583 proteínas correspondientes a diversas categorías funcionales mientras 88 proteínas expresadas corresponderían a proteínas desconocidas o conservadas, cuya función es aún incierta (Lery *et al.*, 2008a). Los resultados obtenidos del estudio comparativo del proteoma de *G. diazotrophicus* durante una curva de crecimiento en un cultivo batch corresponden a un conjunto de proteínas codificadas en el genoma de esa bacteria que pueden ser expresadas de acuerdo al estado fisiológico de las células en tres fases muy marcadas de la curva de crecimiento; y a las alteraciones del medio durante su cultivo en exceso o limitación de nitrógeno (Lery *et al.* 2008b).

Como se marcó anteriormente, de los diferentes sistemas de cultivo que es posible llevar a cabo en biorreactores, los cultivos batch no representan una buena alternativa para el estudio de las respuestas fisiológicas de un organismo. Para estudiar la respuesta fisiológica de un microorganismo a modificaciones voluntarias de alguna condición del ambiente es aconsejable la utilización de cultivos continuos (Herbert *et al.*, 1965; Tempest, 1970). Bajo este contexto, los cultivos continuos de *G. diazotrophicus* permitirán obtener información sobre el flujo de la fuente de carbono alterando las condiciones ambientales del cultivo como diferentes sustratos/nutrientes limitantes, diferentes pHs, empleando amonio ó condiciones de FBN, etc.

#### 1.4.2. MALDI-TOF.

El MALDI-TOF es una espectrometría de masa que utiliza una técnica de ionización suave. Se denomina MALDI por sus siglas en inglés Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (desorción/ionización láser asistida por una matriz) y TOF por el detector de iones que se acopla al MALDI y cuyo nombre procede también de sus siglas en inglés Time Of Flight (Lay, 2002).

El MALDI-TOF permite el análisis de biomoléculas (biopolímeros como las proteínas, los péptidos y los azúcares) y moléculas orgánicas grandes (como los polímeros, los

dímeros y otras macromoléculas) que tienden a hacerse frágiles y fragmentarse cuando son ionizadas por métodos más convencionales (Lay, 2002).

Para el análisis, la macromolécula es primero integrada en una matriz sólida que a menudo consiste en un material orgánico como ácido trans-3-indolacrílico y sales inorgánicas como cloruro de sodio o trifluoroacetato de plata. Se utiliza una matriz para proteger a la biomolécula de su destrucción y para facilitar la vaporización y la ionización de la misma. La muestra es entonces irradiada con un láser pulsado, como un láser de nitrógeno. La mayoría de la energía producida por el láser es absorbida por la matriz provocando la expulsión de iones de la matriz electrónicamente excitados, cationes y macromoléculas neutras, que crean una densa nube de gas por encima de la superficie de la muestra. La macromolécula es ionizada por las colisiones y formación de complejos con pequeños cationes. Las biomoléculas ionizadas son aceleradas en un campo eléctrico (sistema de cuadrupolo), el campo eléctrico se ajusta con unos parámetros para una determinada relación masa/carga, de modo que las moléculas que no cumplan los requisitos de esa relación serán desviadas de la trayectoria. Las moléculas que presentan las características adecuadas y consiguen pasar correctamente a través del campo eléctrico entran en el “tubo de vuelo” (Griffin y Smith 2000, Nyman 2001, Wunschel *et al.* 2005).

El tiempo de vuelo (TOF) se basa en que para una energía cinética constante, la masa y la velocidad de los iones están interrelacionadas. Los campos eléctricos se utilizan para darle a los iones una energía cinética conocida. Si se conoce la energía cinética, se sabe la distancia que viajan los iones y también el tiempo que les lleva viajar y entonces se puede determinar la masa de los iones (Griffin y Smith 2000, Nyman 2001, Wunschel *et al.* 2005).

El “tubo de vuelo” consiste en un espacio al vacío para permitir a los iones viajar de un extremo del instrumento al otro sin la resistencia producida por el choque con las moléculas de aire, que alteraría la energía cinética de la molécula (Griffin y Smith 2000, Nyman 2001, Wunschel *et al.* 2005).

Con esta técnica se pueden detectar moléculas con masa entre 400 y 350000 Da, y dependiendo de la sofisticación del equipo la sensibilidad puede variar en un rango de  $10^{-15}$  a  $10^{-18}$  M (femtomolar y attomolar respectivamente) (Griffin y Smith 2000, Nyman 2001, Wunschel *et al.* 2005).

## 1.5. OBJETIVOS:

Dentro del contexto teórico anteriormente presentado se definieron los siguientes objetivos para este trabajo de Tesis Doctoral.

Como objetivo general se planteo intentar sentar las bases para el desarrollo de una tecnología de producción de FOS y levanos, y de la enzima responsable la síntesis de estos compuestos (LsdA), por *G. diazotrophicus* en escala de laboratorio utilizando diferentes estrategias de cultivos.

Dentro de este planteo general se definieron diferentes objetivos específicos.

1. Debido al desconocimiento de la regulación metabólica de la síntesis de polisacáridos extracelulares por *G. diazotrophicus*, cuando crece en presencia de sacarosa como fuente de carbono y energía, se propuso como primer objetivo específico generar información sobre el comportamiento metabólico de este microorganismo ante diferentes situaciones nutricionales variando la concentración inicial de la fuente de carbono desde condiciones de limitación hasta condiciones de exceso. Paralelamente se ensayaron variaciones en la fuente de nitrógeno teniendo en cuenta a este nutriente como una variable en el contexto nutricional del microorganismo y dando respuestas a diferentes interrogantes metabólicos.
2. El segundo objetivo específico planteado fue conocer cómo varia la síntesis de fructanos de diferentes pesos moleculares y la expresión de la levansacarasa (como enzima responsable de la síntesis de estas macromoléculas) buscando la/s condición/es nutricional/es de máxima producción de fructanos y/o enzima.
3. El tercer objetivo específico presentado fue la optimización de un sistema de producción de fructanos tanto en cultivos batch de *G. diazotrophicus* como en sistemas libres de células en incubaciones de soluciones de sacarosa con extractos crudos de LsdA.

Para cumplir con ambos objetivos específicos se planteó como estrategia la utilización de diferentes sistemas de cultivos (batch y continuos).

A fin de cumplir con el primer objetivo específico la mejor estrategia disponible es la utilización de cultivos continuos seguido de un estudio proteómico tanto de las células



como de proteínas extracelulares (secretoma) de los diferentes estatus nutricionales. Pero, para llevar a cabo los cultivos continuos es necesario conocer diferentes parámetros del crecimiento microbiano en las condiciones de estudio para lo cual se necesita la realización previa de cultivos batch.

Luego, dado que los cultivo batch son la herramienta más utilizada en la producción industrial de la mayoría de los productos biotecnológicos, con la información obtenida en cultivos continuos fue necesario llevar a cabo nuevamente cultivos batch para la optimización a escala de laboratorio de una tecnología de producción de los fructanos (tercer objetivo específico planteado).

# Capítulo 2:

## Materiales y métodos.



## 2.1. Cepa y medio de cultivo

*Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL 5 (ATCC 49037 / LMG 7603). La cepa fue provista por el grupo de la Dra. J. Döbereiner (EMBRAPA, Rio de Janeiro, Brasil). La misma fue mantenida en medio LGI – glicerol 25% v/v a -80 °C y medio LGI-glicerol 50% v/v a -4 °C y por sub-cultivos periódicos en agar papa (Stephan *et al*, 1991).

Todos los medios de cultivo descriptos a continuación fueron esterilizados en autoclave, exceptuando aquellos que contienen sacarosa como principal fuente de carbono que fueron esterilizados por filtración.

### 2.1.1. Medio agar papa:

Extracto de papa	500 ml
Sacarosa	20 g
NaMoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	2,0 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,8 mg
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,08 mg
ZnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,24 mg
Biotina	0,01 mg
Piridoxal	0,2 mg
Agar	14,0 g
H <sub>2</sub> O	500 ml

Se ajusta el pH del medio a 6,0 por agregado de KOH o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> según corresponda.

### 2.1.2. Medio CO<sub>3</sub><sup>=</sup>

Glucosa	50 g
Glicerol	30 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,5 g
CaCO <sub>3</sub>	10 g
Extracto de levadura	5 g
Agar	14,0 g
H <sub>2</sub> O	1000 ml

### 2.1.3. Medio LGI

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,6 g
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,2 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3 g / 0,132 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 g
Acido cítrico	0,2 g
$\text{FeCl} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	10 mg
$\text{CaCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	20 mg
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2 mg
$\text{H}_2\text{O}$	1000 ml

Se ajusta el pH del medio a 6,0 por agregado de KOH o  $\text{H}_2\text{PO}_4$  según corresponda.

La fuente de carbono utilizada fue modificada según el diseño de cada experimento. En general se utilizó sacarosa en diferentes concentraciones, no obstante se han utilizado glicerol y glucosa según se detalla en cada experimento.

### 2.1.4. Medio LGI modificado para cultivos continuos

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,37 g
KCl	0,745 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3 g / 0,132 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,30 g
Acido cítrico	0,2 g
$\text{FeCl} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	10 mg
$\text{CaCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	20 mg
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2 mg
$\text{H}_2\text{O}$	1000 ml

Se ajusta el pH del medio a 6,0 por agregado automático de NaOH o  $\text{H}_2\text{SO}_4$  según corresponda.

La fuente de carbono utilizada fue modificada según el diseño de cada experimento. En el caso particular del  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  se han utilizado 3 g/l para el caso de los cultivos en condición de no FBN, 0,132 g/l en calidad de “starter”, previo a cultivos en condiciones de FBN los cuales, una vez obtenidas estas condiciones, carecen totalmente de fuente nitrogenada inorgánica (Luna *et al.*, 2000).

## 2.2. Biorreactor

Los cultivos tanto batch como continuos se realizados en un biorreactor LH (Incelltech 210) de 2 L con un volumen de trabajo de 1,0-1,5 litros, termostatzado a 30 °C. El flujo de aire fue de 0,15-0,25 VVM. La concentración de O<sub>2</sub> disuelto fue medida continuamente empleando un electrodo polarográfico Ingold (Wilmington, MA, USA) y se mantuvo al nivel deseado de saturación (>20% para No FBN y < 2,0 % para FBN ya que la nitrogenasa se inhibe a valores más elevados (Reis y Döbereiner 1998). Para lograr estas condiciones de valores de saturación O<sub>2</sub> disuelto se varió la velocidad de agitación (150-800 rpm). En los experimentos que se realizaron a pH controlado, el mismo se midió con un electrodo esterilizable Mettler-Toledo y fue mantenido automáticamente al valor deseado (6,0 ± 0.1) por el agregado de NaOH 1N ó H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N. Se tomaron muestras tanto de fase líquida de los cultivos, como de fase gaseosa, periódicamente sobre las que se realizaron los análisis que se detallan a continuación. Luego de registrar el valor de pH del medio, medido con un pHmetro de laboratorio y de Densidad Óptica, la muestra líquida fue centrifugada a 8000 g durante 20 minutos generando un pellet que fue utilizado para medir biomasa y actividades enzimáticas de GDH y GaDH. El sobrenadante se utilizó para medir, fuente de C remanente, polisacáridos y otros productos, y actividades enzimáticas de LsdA. Cada condición de cultivo estudiada se realizó, al menos, por duplicado.

Para el inicio de los cultivos se generaron inóculos crecidos en erlenmeyers de 250 ml conteniendo 50 ml de medio LGI, en las mismas condiciones de fuente de carbono y energía que los cultivos en los cuales iban a ser sembrados. Se centrifugaron dichos caldos después de 48 hs de crecimiento. Los precipitados fueron resuspendidos con solución fisiológica (NaCl 0,8 %p/v), este resuspendido celular fue utilizado como inóculo del reactor.

### 2.2.1. Detección de gases

Las concentraciones de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> en las muestras gaseosas fueron determinadas antes de cada extracción de una muestra líquida del reactor. Para tal fin se empleo un analizador paramagnético de O<sub>2</sub> (Servomex 1100A, Norwood MA, USA) y un analizador

infrarrojo de CO<sub>2</sub> (Horiba PIR 2000, Japón). El flujo de aire a la entrada del biorreactor se midió con un caudalímetro de burbuja.

## 2.3. Determinaciones:

### 2.3.1. Biomasa

Son aceptadas varias formas de determinar el crecimiento bacteriano durante un cultivo. Una de ellas es la constante medición de la densidad óptica (DO) de pequeñas alícuotas del cultivo mediante el uso de un espectro fotómetro. Este tipo de medidas es una forma rápida de realizar un seguimiento del cultivo. En este caso DO de todos los cultivos se midió a una longitud de onda de 560 nm en un espectrofotómetro Beckman DU 640. En el caso de cultivos donde se manifiesta producción de polímeros extracelulares, la medida de DO por absorbancia se consideró sólo una medida aproximada de la biomasa del cultivo. La medición más adecuada de la biomasa real de los cultivos se realizó determinando peso seco de biomasa en alícuotas del cultivo según lo descrito por Herbert *et al.* (1971).

### 2.3.2. Levanos

Según lo publicado por Bekers *et al.* (2002) se precipitaron los polisacáridos de alto peso molecular, levanos, con el agregado de etanol comercial hasta obtener una concentración final de 75% v/v mezclando con el sobrenadante de la muestra obtenida del fermentador o con la muestra obtenida de las incubaciones. En todos los casos se realizó una incubación “overnight” a 4 °C y luego se centrifugó a 8000 g durante 20 minutos. El sobrenadante se descartó y el pellet se seco en estufa a 60 °C hasta obtener un peso constante según lo descrito por Herbert (1971). Luego se procedió a pesar.

### 2.3.3. FOS

De los sobrenadantes de las muestras obtenidas tanto del fermentador como de las incubaciones, se procedió a la determinación cuantitativa de los FOS, por medio de cromatografía en capa delgada (TLC).

## TLC:

El análisis cualitativo de los sobrenadantes de las muestras obtenidas de los reactores, y de las muestras obtenidas de las incubaciones, se realizó por cromatografía en capa delgada sobre placas de sílica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck). Se sembró, espaciadamente 1 µl de cada una de las muestras, realizando diluciones en los experimentos con alto contenido de sacarosa (> 80 g/l). Se empleó como solvente de corrida una mezcla de acetona: H<sub>2</sub>O (90:10), y como revelador una solución de urea (30 g.l<sup>-1</sup>) en PO<sub>4</sub>H<sub>3</sub> 1 M saturado con n-butanol, el cual sólo interacciona con los residuos fructosilos de los polisacáridos (Trujillo Toledo *et al.*, 2004). Como estándares se usaron una mezcla de sacarosa (5 g/l) y fructosa (5 g/l), y una segunda mezcla de nistosa y 1-kestosa (5 g/l de c/u).

### 2.3.4. Ácido glucónico

De los sobrenadantes de las muestras obtenidas del fermentador se procedió a la determinación cuantitativa de ácido glucónico y ceto-ácidos derivados con el uso de la técnica de cromatografía de alta performance (HPLC).

#### Preparación de la muestra:

La muestra a ser analizada fue preparada como se indica anteriormente para el caso de la determinación de FOS por HPLC.

#### Metodología de corrida:

Las muestras fueron inyectadas automáticamente con el uso de un inyector Waters 717 plus Autosampler, el volumen de inyección fue de 20 µl. Se utilizó un equipo Waters equipado con una bomba binaria 1525 Waters, la columna utilizada fue una PRP-X300 Hamilton 250 x 4,1 mm, termostatizada a 25 °C utilizando como fase móvil fue H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a pH 1,7 a un flujo de corrida fue de 1,0 ml/min. Los analitos fueron detectados por un detector Waters 2996 Detector de Arreglo de Diodos (DAD) a  $\lambda = 210$  nm. Todos los análisis computacionales fueron realizados utilizando el programa Empower Software.



### 2.3.5. Glucosa

En los sobrenadantes de las muestras líquidas provenientes del reactor y en las muestras de las incubaciones se realizó un análisis cualitativo de la glucosa existente en el medio. En el caso de las incubaciones este análisis nos ayuda a verificar qué porcentaje de la sacarosa es hidrolizada, ya que en estos experimentos la glucosa es un producto residual de la producción enzimática de fructooligosacáridos. La concentración de glucosa fue cuantificada utilizando un kit comercial enzimático de glucosa-oxidasa (Wiener, Argentina; Bergmeyer y Bernt, 1977).

### 2.3.6. Amonio.

En los sobrenadantes de las muestras provenientes del reactor se realizó un análisis cualitativo del amonio presente en el medio de cultivo por el método propuesto por Chany y Marbach (1962).

Para una muestra con 1-5  $\mu\text{g/ml}$  mezclar 80  $\mu\text{l}$  de muestra con 1 ml de solución A más 1 ml de solución B. Incubar a 37 °C por 30 minutos y leer absorbancia en espectrofotómetro a 625 nm. La colorimetría es estable por 24 horas.

Reactivos usados:

Solución A	
fenol	6,6 g
Nitroprusiato de sodio	28,5 mg
H <sub>2</sub> O destilada	500 ml
Solución B	
NaOH	10,02 g
Lavandina comercial	5 ml
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	17,34 g
H <sub>2</sub> O destilada	495 ml

## 2.3.7. Actividades enzimáticas.

### 2.3.7.1. LsdA

La actividad levansacarasa fue medida como la glucosa liberada de la hidrólisis de la sacarosa, medida con un kit colorimétrico comercial de glucosa-oxidasa (Wiener, Argentina; Bergmeyer y Bernt, 1977). La actividad enzimática fue determinada bajo las siguientes condiciones: 0,25 M de sacarosa en buffer acetato de sodio 0,1 M, pH 5,2 a 40 °C. Donde se define una unidad de actividad enzimática como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1  $\mu\text{mol}$  de glucosa por minuto, basada en la medición de velocidades iniciales, en las condiciones detalladas por Hernández et al. (1999).

### 2.3.7.2. GDH-PQQ

Los ensayos espectrofotométricos de glucosa deshidrogenasa (GDH) PQQ-dependiente (EC 1.1.99.17) se midieron utilizando 2,6-diclorofenol-indofenol (DCIP) y metosulfato de fenazina (MPS), según el método de Matsushita (1982) modificado para células enteras. Se midieron las actividades de las enzimas en todos los cultivos y en todas las etapas de cada uno de ellos empleando un espectrofotómetro Beckman DU 640. Cada determinación se realizó en dos oportunidades diferentes, cada una por duplicado, y sus actividades fueron promediadas. Para todos los ensayos realizados se utilizaron células colectadas en cada alícuota líquida del cultivo las cuales fueron centrifugadas a 12.000 g, 4 °C, y el pellet fue lavado dos veces con buffer fosfato 10 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM, Tritón 0,1 % v/v (pH: 6,0). Luego del último lavado, el pellet fue resuspendido en el mismo buffer fosfato con la ausencia de Tritón, la concentración celular final fue de 4,5 mg de células/ml para todos los casos. Las medidas de actividad en células enteras se realizaron a 25 °C, pH 6,0. No fue necesaria la incubación con PQQ en las medidas de actividad de GDH, ya que en *G. diazotrophicus* este cofactor está unido covalentemente a la apoenzima (Galar y Boiardi, 1995). La glucosa se agregó para iniciar la reacción a una concentración final de 200 mM. En todos los ensayos se realizó una cinética enzimática donde la velocidad de reacción fue linealmente proporcional a la cantidad de

extracto celular adicionado. La actividad específica de la enzima se expresó en nmoles de DCIP reducidos/ (mg proteína min), según el siguiente cálculo:

Actividad específica= Actividad enzimática/[prot]

Actividad enzimática=  $V_o \cdot V_M \cdot 10^6 / (\epsilon_{DCIP} \cdot V_m)$

$V_o$ :  $\Delta A / \Delta t$  = Velocidad inicial de consumo de DCIP.

$\Delta A$ : disminución de Absorbancia a 600 nm en un  $\Delta t$ .

$\Delta t$ : intervalo de tiempo (primeros 10-15 segundos de reacción)

$V_M$  : Volumen de mezcla de reacción en ml.

$V_m$  : Volumen de muestra en  $\mu\text{l}$ .

$\epsilon_{DCIP}$  : Coeficiente de extinción molar del DCIP que toma el valor de  $10 \text{ (mM.cm)}^{-1}$ .

[prot]: Concentración de proteínas en mg/ml, teniendo en cuenta que el contenido de proteínas esta en el orden del 60 % de la biomasa.

### 2.3.7.3. GDH-NAD

Las medidas de actividad de glucosa deshidrogenasa NAD-dependiente (EC. 1.1.1.47) se realizaron en extractos libres de células (ELC) según las técnicas propuestas por De Ley (1966) modificada. Las muestras fueron tomadas de cultivos tanto batch como continuos en las diferentes condiciones ensayadas de igual manera que para las medidas enzimáticas en células enteras. Un volumen de 10 ml de cultivo fueron centrifugados a 8000 g durante 20 minutos, las células obtenidas fueron lavadas 2 veces como se describe para el método de GDH-PQQ dependiente. Aproximadamente 0,25 g/ml de células fueron sometidos a rotura por sonicación a 4 °C en un Sonicador Soniprep 150, de acuerdo a lo reportado por Atwood *et al.*, (1991). El extracto celular se centrifugó 2 veces 20 minutos a 15.000 g. El sobrenadante se llevó a una concentración de proteínas de 1 mg/ml con el buffer de lavado y se empleó como ELC. La concentración de proteínas en la mezcla de reacción fue de 0,05 mg/ml. El buffer utilizado fue  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM pH 7.6.

#### 2.3.7.4. GaDH

Los ensayos para evaluar el contenido de gluconato deshidrogenasa (GaDH) (EC 1.1.99.3) se realizaron según el método de Matsushita y Ameyama (1982) modificado para células enteras como se detalló en el ítem anterior. En este caso, como sustrato enzimático se utilizó gluconato de sodio que fue agregado a la mezcla de reacción obteniendo una concentración final de 200 mM. En todos los ensayos enzimáticos la velocidad de reacción fue linealmente proporcional a la cantidad de extracto celular adicionado. La actividad específica de la enzima se expresó en nmoles de DCIP reducidos/ (mg proteína.min), según el siguiente cálculo:

Actividad específica= Actividad enzimática/[prot]

Actividad enzimática=  $V_o \cdot V_M \cdot 10^6 / (\epsilon_{DCIP} \cdot V_m)^{-1}$

$V_o$ :  $\Delta A / \Delta t$  = Velocidad inicial de consumo de DCIP.

$\Delta A$ : disminución de Absorbancia a 600 nm en un  $\Delta t$ .

$\Delta t$ : intervalo de tiempo (primeros 10-15 segundos de reacción).

$V_M$  : Volumen de mezcla de reacción en ml.

$V_m$  : Volumen de muestra en  $\mu$ l.

$\epsilon_{DCIP}$  : Coeficiente de extinción molar del DCIP que toma el valor de  $10 \text{ (mM.cm)}^{-1}$ .

[prot]: Concentración de proteínas en mg/ml, teniendo en cuenta que el contenido de proteínas representa el 60 % de la biomasa.

## 2.4. Producción de levanos en sistema batch libre de células

2.4.1. Diferentes fuentes de carbono para el crecimiento celular y posterior obtención del sobrenadante, y diferentes diluciones de sobrenadantes a 30°C.

### 2.4.1.1. Generación de pre-inóculo:

Se creció *G. diazotrophicus* PAL 5 wt en medio LGI con sacarosa como fuente de carbono y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  como fuente de nitrógeno, crecidos durante 48 hs en agitador rotatorio termostatzado a 30 °C.

### 2.4.1.2. Medios de Cultivo:

- LGI pH 6,00 con 20 g/l de sacarosa como fuente de carbono y energía, y enriquecido con 1.5 g/l de extracto de levadura y 1.5 g/l triptona como fuente de nitrógeno. Esterilizado por filtración.
- LGI pH 6,00 con 15 g/l de glicerol como fuente de carbono y energía, y enriquecido con 1.5 g/l de extracto de levadura y 1.5 g/l triptona como fuente de nitrógeno.

Los pre-inóculos fueron centrifugados a 10000 g durante 15 minutos, el pellet de microorganismos se resuspendió en solución fisiológica. Se utilizó volumen suficiente para que los medios de cultivos tenga una concentración inicial equivalente a una DO = 0.09. Los cultivos se dejaron crecer durante 10 días.

Los medios de cultivos crecidos se centrifugaron a 16000 g durante 30 minutos. Las diluciones realizadas son de los sobrenadante a concentración final. Las diluciones correspondiente se realizo con la solución de buffer acético/acetato pH 5.2 y sacarosa 100 g/l esterilizada por filtración. La incubación se llevo a cabo en agitador rotatorio a 200 rpm termostatzado a 30° C .

### 2.4.1.3. Diluciones empleadas:

- 1/20
- 1/10
- 1/2
- Directo (3/4)

Se tomaron muestras a  $t_0 = 0$  hs,  $t_1 = 12$  hs,  $t_2 = 24$  hs,  $t_3 = 48$  hs,  $t_4 = 72$  horas,  $t_5 = 96$  horas,  $t_6 = 7$  días, procesadas según muestras para peso seco de polisacáridos, muestra para TLC y cuantificación de glucosa libre.

Para los medios de cultivos conteniendo sacarosa como fuente de carbono y energía la sacarosa fue esterilizada por filtración. Cada ensayo se repitió como mínimo 2 veces.

## 2.4.2. Diferentes temperaturas

### 2.4.2.1. Generación de pre-inóculo:

Se creció *G. diazotrophicus* PAL 5 wt como se detallo anteriormente.

### 2.4.2.2. Medio de Cultivo:

- LGI pH 6,00 con 20 g/l de sacarosa como fuente de carbono y energía, y enriquecido con 1.5 g/l de extracto de levadura y 1.5 g/l triptona como fuente de nitrógeno. Esterilizado por filtración

Los pre-inóculos fueron centrifugados a 10000 g durante 15 minutos, el pellet de microorganismos se resuspendió en solución fisiológica. Se utilizó volumen suficiente para que los medios de cultivos tenga una concentración inicial equivalente a una DO = 0.09. Los cultivos se dejaron crecer durante 10 días.

Los medios de cultivos crecidos se centrifugaron a 16000 g durante 30 minutos. Las diferentes diluciones de los sobrenadante se llevaron a concentraciones finales, indicadas a continuación, con una solución de sacarosa de 100 g/l en buffer

acético/acetato pH 5.2 la cual fué esterilizada por filtración. La incubación se llevo a cabo a 30 °C y a 40 °C en agitador rotatorio a una velocidad de 200 rpm.

#### **2.4.2.3. Las diluciones empleadas fueron:**

- 1/20
- 1/10
- 1/2
- Directo (3/4)

Se tomaron muestras a  $t_0 = 0$  hs,  $t_1 = 12$  hs,  $t_2 = 24$  hs,  $t_3 = 48$  hs,  $t_4 = 72$  horas,  $t_5 = 96$  horas,  $t_6 = 7$  días, procesadas según muestras para peso seco de polisacáridos, muestra para TLC y cuantificación de glucosa libre.

Cada ensayo se repitió como mínimo 2 veces.

#### **2.4.3. Diferentes concentraciones de sacarosa para diluciones constantes del sobrenadante a 40°C**

##### **2.4.3.1. Generación de pre-inóculo:**

Se creció *G. diazotrophicus* PAL 5 wt como se detallo anteriormente.

##### **2.4.3.2. Medio de Cultivo:**

La obtención del sobrenadante del medio de cultivo, y los pasos para diluir dicho sobrenadante con el buffer acético/acetato fueron iguales que para el ensayo anterior.

La sacarosa fué agregada a cada dilución del sobrenadante según como se describe más adelante. En estos experimentos la sacarosa no fue esterilizada por considerar que las concentraciones tan elevadas de la misma, y la presión osmótica generada en estas condiciones no permitirían el crecimiento microbiano de contaminantes.

**2.4.3.3. Las concentraciones de sacarosa:**

- 300 g/l
- 700 g/l

**2.4.3.4. Las diluciones de los sobrenadantes:**

- 1/20
- Directo (3/4)

Se tomaron muestras a  $t_0 = 0$  hs,  $t_1 = 12$  hs,  $t_2 = 24$  hs,  $t_3 = 48$  hs,  $t_4 = 72$  horas,  $t_5 = 96$  horas,  $t_6 = 7$  días, procesadas según muestras para peso seco de polisacáridos, muestra para TLC y cuantificación de glucosa libre.

Cada ensayo se repitió como mínimo 2 veces.



## 2.5. Proteómica

Las muestras fueron colectadas de cultivos continuos en estado estacionario realizados bajo condiciones variables de fuente de carbono, limitados (20 g/l sacarosa) y no limitados (100 g/l sacarosa), y nitrógeno (FBN y NoFBN). Se colectaron aproximadamente 700 ml de cada cultivo. A dichas muestras se le agregó phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) de forma de obtener una concentración final de 0,2 mM (Dumas et al. 2009) y se centrifugó a 16000 g durante 30 minutos (He and Wang 2008), obteniéndose un pellet celular y un sobrenadante. Tanto las células como el sobrenadante fueron liofilizados totalmente.

### 2.5.1. Células

#### 2.5.1.1. Preparación de muestra

El material celular se resuspendió en buffer tris 20mM + 0,2 mM PMSF previo lavado con buffer tris 20 mM + tween 20. Para poder cuantificar inicialmente el contenido proteico de estas muestras se realizo una lisis alcalina de las células y una cuantificación proteica por el método de Bradford (1976).

##### 2.5.1.1.1. Lisis alcalina.

Se tomaron 300 µl de la suspensión de células antes descriptas y se agregaron 300 µl de NaOH 1M, se incubó 30 minutos a 65 °C. Luego se centrifugó a 10000 g durante 2 minutos. De los sobrenadantes obtenidos se cuantifico proteínas.

Inicialmente se realizó un ensayo de las mejores condiciones para el preparado de las muestras. Primeramente se procedió a realizar el rompimiento celular con dos ciclos de sonicación de 30 minutos cada uno, amplitud 50%. El sonicador empleado fue un Sonic Dismembrator Model 500 (Fisher Scientific). Luego, un set de muestras fueron procesadas directamente y otras dos se les aplicaron dos métodos diferentes para la precipitación de proteínas empleando detergentes y/o solventes para precipitar las

proteínas. Los dos tratamientos de extracción ensayados fueron un tratamiento con cetyl-trimethylammonium (CTAB), y un tratamiento con acetona-tricloroacético (acetona-TCA).

#### **2.5.1.1.2. Tratamiento con CTAB.** (Polati *et al.*, 2009)

Al material obtenido del sonicado se le agregaron 2 ml de una solución de buffer tris 1M, NaCl 4M, 2% de CTAB, pH 7,5. Se incubó por 1 hora a 37 °C y se realizó una dilución 1/5 con agua mili-Q, luego se centrifugó 15 minutos a 5000 g. Al sobrenadante resultante se le agregó 1/4 volumen de acetona-metanol (8:1) frío, y se conservó durante 2 horas en baño de hielo. Luego se centrifugó durante 15 minutos a 5000 g y se realizaron lavados del precipitado con etanol 70%. La resuspensión del pellet proteico se realizó con 600 µl de buffer de hidratación (7M urea, 2M tiourea, 2% CHAPS, 0,5% PG buffer, 0,002% azul de bromofenol). La cuantificación de proteínas de estas muestras se realizó mediante el uso del kit comercial 2-D Quant kit de Amersham Biosciences.

#### **2.5.1.1.3. Tratamiento con acetona-TCA.** (He y Wang, 2008)

A las células sonicadas se les agrego 1/4 volumen de acetona con 50 % p/v de TCA, se incubó a 4 °C durante 1 hora y luego se centrifugó a 5000 g durante 60 minutos, todo termostatzado a 4 °C. El precipitado fue lavado con acetona, 0,2% ditiotritol (DTT), como mínimo 3 veces. El precipitado limpio se dejo secar y se resuspendió en 1 ml de buffer de hidratación (7M urea, 2M tiourea, 2% CHAPS, 0,5% PG buffer, 0,002% azul de bromofenol). La cuantificación de proteínas de estas muestras se realizo mediante el uso del kit comercial 2-D Quant kit de Amersham Biosciences.

### **2.5.1.2. Electroforesis SDS-PAGE.**

#### Armado del gel:

Los geles utilizados son de 12cm x 8 cm de 12% de poliacrilamida, la corrida electroforética se realizo en una cuba de GE Healthcare. Las muestras protéicas fueron resuspendidas en un buffer de muestra SB 5x con la siguiente composición:

Solución	Concentración
Tris-HCl 50 mM pH 6,8.	250 mM
Glicerol	20 %
SDS	0,2 %
Azul de bromo fenol	0,2 %
DTT	200 mM

Para preparar 1 gel de separación se utilizaron :

Solución	Volumen
Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8	1,25 ml
Acrilamida-bis acrilamida (29:1) 40% (p/v)	1,5 ml
SDS 10%	50 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O mili-Q	2,175 ml
APS (persulfato de amonio 10%)	50 $\mu$ l
TEMED	2,5 $\mu$ l

Para preparar 1 gel de staquing se utilizaron :

Solución	Volumen
Tris-HCl 0,5 M, pH 6,5	0,65 ml
Acrilamida-bis acrilamida (29:1) 40% (p/v)	244 $\mu$ l
SDS 10%	25 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O mili-Q	2,175 ml
APS (persulfato de amonio 10%)	25 $\mu$ l
TEMED	5 $\mu$ l

#### Condiciones de corrida del gel.

El gel se corrió a voltaje fijo de 180 v durante aproximadamente 1 hora 20 minutos en buffer Tris base 250 mM, glicina 2,5 mM, SDS 1% (p/v).

#### Teñido del gel.

#### Tinción con coomassie blue.

Se utilizó coomassie blue comercial, PhastGel Blue G Amersham Biosciences.

Soluciones utilizadas:

- Solución de fijación: 0,83 % (v/v) ácido fosfórico, 16,53 % (v/v) metanol.
- Solución de tinte: 0,1% PhastGel Blue R.
- Solución de decoloración: H<sub>2</sub>O.

Procedimiento:

1. Retirar el gel de la cuba y colocarlo en una fuente de vidrio
2. Agregar 600 ml de solución de fijación por cada gel
3. Incubar 60 minutos
4. Retirar la solución de fijación y agregar la solución de tinte al 0,1% o al 0,02% de coomassie.
5. Dejar incubar overnight.
6. Retirar la solución de tinte.
7. Colocar la solución de decoloración e incubar hasta decoloración deseada.

### 2.5.1.3. Electroforesis 2D.

#### 2.5.1.3.1. Isoelectroenfoque - primera dimensión:

se tomaron 200 µg de proteínas y se resuspendió en DeStreak Rehydration Solution (N° cat 17-6003-19), GE Healthcare hasta alcanzar 250 µl de volumen final. La hidratación del gel se realizó por incubación overnight. Las tiras utilizadas son Immobiline Drystrip pH 3-10, 13 cm (N° cat 17-6001-14) GE Healthcare.

Una vez realizada la hidratación de las tiras se procedió a realizar la corrida electroforética en un equipo, IPGphor de GE Healthcare.

Protocolo de corrida:

- |                    |                                    |          |
|--------------------|------------------------------------|----------|
| 1. 0 hs-2 hs       | a 500 V                            | 1000 Vh. |
| 2. 1 hs-2:05 hs    | gradiente desde 500 V hasta 1000V  | 800 Vh   |
| 3. 2:05 hs-4:35 hs | gradiente desde 1000 V hasta 8000V | 11300 Vh |
| 4. 4:35 hs-4:57 hs | a 8000 V                           | 5400 Vh  |

Total utilizado 18500 Vh

El protocolo de corrida del IEF fue controlado por el programa Ettan IPGphor 3.

### 2.5.1.3.2. Gel SDS-PAGE- segunda dimensión. (2-D Electrophoresis principles and methods)

Se tomaron las tiras resultantes del IEF y se procedió a equilibrarlas. Se debe recordar que el isoelectroenfoco es una electroforesis nativa, y la segunda electroforesis se realiza en condiciones desnaturizantes, por lo que la equilibración de las tiras del IEF se realiza con soluciones que producen la desnaturización completa de las proteínas (buffer de equilibrio). Se tomaron 10 ml de buffer de equilibrio y se procedió a una primera incubación con DTT de 15 minutos, y luego una segunda incubación con iodoacetamida durante 15 minutos.

- Buffer de equilibrio.(6 M urea, 75 mM Tris-HCl pH 8.8, 29.3% glycerol, 2% SDS, 0.002% bromophenol blue)

Agregar 100 mg de DTT por cada 10 ml de solución para el 1<sup>er</sup> paso de equilibración.

Agregar 250 mg de iodoacetamida por cada 10 ml de solución para el 2<sup>do</sup> paso de equilibración.

#### Armado del gel:

Los geles utilizados son de 18cm x 16 cm y la corrida electroforetica se realizo en una cuba tipo “Hoefler SE 600 Ruby” de GE Healthcare. Para preparar 2 geles de 45 ml cada uno se utilizaron :

Solución	Volumen
G	29,97 ml
H	22,5
SDS	0,9 ml
H <sub>2</sub> O mili-Q	36,18 ml
APS (persulfato de amonio 10%)	450 µl
TEMED	29,7 µl

Soluciones:

- Solución G, acrilamida (30% acrylamide, 0.8% N,N'-methylenebisacrylamide).
- Solución H 4x (1.5 M Tris base, pH 8.8)
- Solución 10 % SDS.
- Buffer de corrida 10x (250 mM Tris base, 1.92 M glycine, 1% SDS).

Condiciones de corrida del gel.

En todos los casos los geles se corrieron a amperaje fijo. Siendo los primeros 15 minutos a 10 mA por gel y luego hasta el final a 25-30 mA por gel. Duración estimada de la segunda fase de corrida, aproximadamente 4 horas.

Teñido del gel, tinción con coomassie blue.

Se utilizo coomassie blue comercial, PhastGel Blue R (N° cat. 17-0518-01) Amersham Biosciences.

Soluciones utilizadas:

- Solución de fijación: 40% etanol, 10% ácido acético.
- Solución de teñido: 0,1% PhastGel Blue R, 20% ácido acético.
- Solución de decoloración: 30% etanol, 10% ácido acético.

Procedimiento:

8. Retirar el gel de la cuba y colocarlo en una fuente de vidrio
9. Agregar 250 ml de solución de fijación por cada gel
10. Incubar 30 minutos
11. Retirar la solución de fijación y agregar la solución de teñido al 0,1% o al 0,02% de coomassie.
12. Dejar incubar overnight.
13. Retirar la solución de teñido.
14. Colocar la solución de decoloración e incubar hasta decoloración deseada.

#### 2.5.1.4. Análisis software.

El software empleado para el análisis comparativo de los geles fue ImageMaster 2D Platinum 7.0 (GE Healthcare), previamente se procedió la adquisición de la imagen de los geles de poliacrilamida con el empleo de un scanner y el software antes mencionado.

#### 2.5.2. Sobrenadantes

##### 2.5.2.1. Preparación de muestra

Inicialmente se realizó un ensayo de las mejores condiciones para el preparado de las muestras, ya que son muestras que poseen altas cantidades de polisacáridos. Dos de los métodos utilizados emplean detergentes y/o solventes para precipitar las proteínas como en el caso del material celular descrito anteriormente. Se ensayaron dos tratamientos para la extracción de proteínas, tratamientos con cetyl-trimethylammonium (CTAB), tratamientos con acetona-tricloroacético (acetona-TCA), en ambos se realizó un set de muestras en las cuales se precipitaron los polisacáridos con el agregado de 2 volúmenes de etanol al 98% antes de realizar los tratamientos correspondientes.

##### 2.5.2.1.1. Tratamiento con CTAB. (Polati *et al.*, 2009)

Los sobrenadantes liofilizados se resuspendieron en agua mili-Q. a un set de muestras se le agregó 2 volúmenes de etanol absoluto, se incubaron 1 hora a 4 °C y luego se centrifugaron durante 15 minutos a 5 g. El pellet fue desechado ya que contendrían los polisacáridos, y los sobrenadantes fueron tratados en conjunto con las muestras no precipitadas previamente.

A los sobrenadantes re suspendidos se le agregó 1/4 volumen de acetona-metanol (8:1) y se dejó 2 horas incubando a -20 °C, luego se centrifugaron durante 15 minutos a 5000 g. El pellet resultante fue resuspendido en 2,5 ml de una solución de buffer tris 1M, NaCl 4M, 2% de CTAB, pH 7,5. Se dejó incubar 1 hora a 37 °C y se realizó una dilución 1/10 con agua mili-Q, luego se centrifugó 15 minutos a 5000 g. Al sobrenadante resultante se le agregó 1/4 volumen de acetona-metanol (8:1) frío, y se

conservo durante 2 horas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Luego se centrifugo durante 15 minutos a 5000 g y se realizaron lavados del precipitado con etanol 70%. La resuspensión del pellet proteico se realizo con 400  $\mu\text{l}$  de buffer de hidratación (7M urea, 2M tiourea, 2% CHAPS, 0,5% PG buffer, 0,002% azul de bromofenol). La cuantificación de proteínas de estas muestras se realizo mediante el uso del kit comercial 2-D Quant kit de Amersham Biosciences.

#### **2.5.2.1.2. Tratamiento con acetona-TCA. (He y Wang, 2008)**

Los sobrenadantes liofilizados se resuspendieron en agua mili-Q. a un set de muestras se le agrego 2 volúmenes de etanol absoluto, se incubaron 1 hora a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . En este momento se procedió conjuntamente con las muestras no precipitadas con etanol. A todas las muestras se agrego 1/4 volumen de acetona con 50 % p/v de TCA, se dejo incubar a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  y luego se centrifugo a 5000 g durante 60 minutos, todo termostatzado a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . El precipitado fue lavado con acetona, 0,2% ditiotritol (DTT), como mínimo 3 veces. El precipitado limpio se dejo secar y se resuspendio en buffer tris 20 mM, luego fue cuantificado por el método de Bradford ( 1976).

#### **2.5.2.1.3. Tratamiento mediante dializado.**

Luego de realizar el pie de cuba del fermentador, se centrifugo la muestra obtenida como se detallo anteriormente y se agrego PMSF de forma de obtener una concentración final de 0,2 mM, luego se realizo una reducción de volumen en atmosfera reducida (rota vapor) hasta concentrar aproximadamente 6 veces el volumen. Al resultado se agrego 2 volúmenes de etanol e incubación durante 15 min en agua hielo, luego se centrifugo durante 30 min a 10000 rpm para la precipitación de los polisacáridos según describe (Hernández et al. 1995). Se realizo una segunda reducción de volumen bajo atmosfera reducida pero colocando una trampa de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  3 N para la captura del etanol. El resultado se dializo con una membrana de cut off de 10 KDa, frente a  $\text{H}_2\text{O}$  mili-Q en heladera durante 36 hs realizando cambios periódicos del  $\text{H}_2\text{O}$  cada 2 horas y dejando overnight con resina de intercambio iónico mixta (AG 501-X8 Resin Bio-Rad Cat # 142-6424).



## 2.5.2.2. Electroforesis SDS-PAGE.

### Armado del gel:

Los geles utilizados son de 18cm x 16 cm y la corrida electroforetica se realizo en una cuba tipo “Hoefer SE 600 Ruby” de GE Healthcare. Para preparar 1 geles de 45 ml se utilizaron:

<b>Solución (ver apartado 2.5.1.3.2)</b>	<b>Volumen</b>
G	15 ml
H	11,25
SDS	0,45 ml
H <sub>2</sub> O mili-Q	18 ml
APS (persulfato de amonio 10%)	225 µl
TEMED	15 µl

### Condiciones de corrida del gel.

En todos los casos los geles se corrieron a amperaje fijo. Siendo los primeros 15 minutos a 10 mA por gel y luego hasta el final a 25-30 mA. Duración estimada de la segunda fase de corrida, aproximadamente 2 horas.

Teñido del gel, tinción con coomassie blue. Como se indicó anteriormente.

## 2.5.2.3. Electroforesis 2 D

### **2.5.2.3.1. Isoelectroenfoque – primera dimensión:**

Según la cuantificación de proteínas, se tomaron 25 µg de proteínas y se resuspendio en Drestrik buffer hasta alcanzar 250 µl de volumen final

La hidratación del gel se realiza por incubación overnight. Las tiras utilizadas son Immobiline Drystrip pH 4-7, 13 cm (N° cat 17-6001-13).

Una vez realizada la hidratación de las tiras se procedió a realizar la corrida electroforética como se detalló anteriormente.

Protocolo de corrida:

1. 0 hs-3 hs	a 500 V	500 Vh.
2. 1 hs-2:05 hs	gradiente desde 500 V hasta 1000V	800 Vh
3. 2:05 hs-4:35 hs	gradiente desde 1000 V hasta 8000V	11300 Vh
4. 4:35 hs-4:57 hs	a 8000 V	5400 Vh

Total utilizado 18800 Vh

El protocolo de corrida del IEF fue controlado por el programa Ettan IPGphor 3.

### 2.5.2.3.2. Gel SDS-PAGE- segunda dimensión.

Se utilizaron las tiras resultantes del IEF. Antes de realizar la corrida de la 2da dimensión se equilibraron las tiras como se detalló anteriormente para el material celular.

Teñido del gel, tinción con plata.

Se utilizó un kit comercial, PlusOne Silver Staining Kit, Protein (N° cat. 17-1150-01) GE Healthcare.

Soluciones utilizadas:

- Solución de fijación: 30% v/v etanol, 10% v/v ácido acético.
- Sensitizing solution: 30 % v/v etanol, 4% v/v de solución de tiosulfato de sodio, 6,8 % p/v de acetate de sodio, 0,5 % v/v de glutaldehido agregado inmediatamente antes de usar.
- Silver solution: 10 % v/v de solución de nitrato de plata, agregar 100 µl/250 ml de formaldehido inmediatamente antes de usar.
- Developing solución: 2,5% p/v de carbonato de sodio, agregar 200 µl/250 ml de formaldehido inmediatamente antes de usar.
- Stop solution: EDTA-Na.
- Solución de lavado: H<sub>2</sub>O destilada.

- Solución de preservación: 30% v/v etanol, 4,6% v/v glicerol.

#### 2.5.2.4. Análisis software

El software empleado para el análisis comparativo de los geles fue ImageMaster 2D Platinum 7.0 (GE Healthcare), previamente se procedió la adquisición de la imagen de los geles de poliacrilamida con el empleo de un scanner y el software antes mencionado.

## 2.6. Purificación y análisis de proteínas de membrana.

Se tomaron aproximadamente una concentración de  $10^8$  UFC y se centrifugó durante 8 minutos a 5000 rpm. Los pellets celulares se resuspendieron en buffer SP (NaCl 8,5 g/l,  $K_2HPO_4$  7 g/l,  $KH_2PO_4$  3 g/l, pH 7,2). La resuspensión celular fue sonicada durante; 15 pulsos 15 segundos con intervalos de 15 segundos en un sonicador Sonic Dismembrator Model 500 (Fisher Scientific). El extracto celular se centrifugo a 13000 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante fue ultr-centrifugado a 144000 g durante 1 hora, a 4 °C.

El pellet obtenido son las membranas celulares, tanto interna como externa. Para purificar la membrana externa de la interna se resuspendio el pellet obtenido en el paso anterior en 1 ml de buffer SP y se agrego Sarkosyl NL97 0,5 % final. La preparación se incubo a 28 °C durante 30 minutos y luego se centrifugo en ultracentrífuga 100000 g durante 1 hora, a 4 °C. Separando el precipitado del sobrenadante se obtienen en el sobrenadante las proteínas de membrana interna mientras que en el pellet se encuentran las proteínas de membrana externa, resuspenderlo en 500 µl de buffer SP.

Finalmente se procedió a la cuantificación de proteínas tanto de membrana interna como externa con la utilización de un kit fluorescente Quant-IT y se utilizo el Qubit para realizar la lectura de la fluorescencia y posterior cuantificación de proteínas. Posteriormente se procedió a realizar un SDS-PAGE como se describió anteriormente.

## 2.7. MALDI-TOF/TOF.

Para el análisis por espectroscopia de masa o MALDI-TOF/TOF, primeramente, a la muestra a analizar se le debe realizar una digestión trípica.

### 2.7.1. Preparado de la muestra (Shewchenko *et al.*, 1996).

#### 2.7.1.1. Extracción y digestión trípica de proteínas.

1. Seleccionar la banda del SDS-PAGE o el spot del 2-DE a ser analizada.
2. Cortar las bandas del gel y picarlos en pedazos menores a 1 mm<sup>2</sup>. Desplazar cualquier exceso de poliacrilamida. Utilizar un pedazo del gel para usar como control negativo. Como control positivo se puede usar la banda o spot del patrón de peso molecular correspondiente a la BSA.
3. Decolorar los pedazos de gel con una solución de acetonitrilo 50 %, (NH<sub>4</sub>)HCO<sub>3</sub> 25 mM pH 8,0. Hacer lavados de 30 minutos, con 400 µl cada vez hasta que el gel quede transparente.
4. Remover otros colorantes y deshidratar el gel con 200 µl de acetonitrilo por 5 minutos. Remover el acetonitrilo y secar completamente a temperatura ambiente.
5. Preparar la tripsina y resuspender en (NH<sub>4</sub>)HCO<sub>3</sub> 40 mM, acetonitrilo 10 % a concentración final de tripsina 15 ng/µl. (tripsina promega #cat V5280).
6. Agregar la solución de tripsina a los geles deshidratados de forma de cubrir los pedazos de los geles. Mantener en hielo durante 30 minutos.
7. Incubación overnight a 37 °C.
8. Concentrar la muestra hasta 20 µl.

#### 2.7.1.2. Preparado de la matriz.

1. Disolver la matriz de HCCA de AnchorChip<sup>TM</sup> 600 en matriz líquida (50 % acetonitrilo, 0,1% trifluoroacético (TFA)).
2. Disolver hasta solución saturada.
3. Vortear por 1 minuto y centrifugar por 1 minuto a máxima velocidad.
4. Mezclar 1 µl de solución de matriz con 1 µl de solución péptida digerida.

5. Trasvasar 1  $\mu$ l a la placa de MALDI.
6. Dejar secar a temperatura ambiente.

### 2.7.2. Condiciones de operación.

El equipo empleado fue un Bruker MALDI-TOF/TOF Autoflex II en modo de uso reflectivo positivo con una cantidad de 50 tiros de frecuencia 50 Hz en un rango de masa desde 800 hasta 3200 Dz. El voltaje de aceleración aplicado fue de: placa 1: 19,00 kV y placa 2: 16,80 kV con un pulso de ion extracción de 100 ns.

### 2.7.3. Búsqueda en la base de datos.

Los fragmentos obtenidos fueron comparados en la base de datos MASCOT ([http://www. Matrixscience.com/](http://www.Matrixscience.com/)) para la búsqueda e identificación de las proteínas correspondientes a los fragmentos peptídicos obtenidos y detectados en el paso anterior.

# Capítulo 3:

Cultivos batch de *Gluconacetobacter diazotrophicus* con sacarosa como fuente de carbono y energía.



### 3.1. Cultivos Batch y producción de biomasa.

El modelado y la simulación del crecimiento microbiano generan información valiosa a nivel teórico y práctico. El modelo más utilizado hasta nuestros días es el diseñado por Monod en 1949, el cual es una buena herramienta para predecir el crecimiento bacteriano en su etapa de crecimiento exponencial (Monod J., 1949).

Una típica curva de crecimiento microbiano en cultivos batch es el resultado de cambios continuos de la velocidad específica del crecimiento del microorganismo con respecto al tiempo dependiendo del status nutricional del medio de cultivo. Así se puede determinar que a diferentes composiciones del medio de cultivo las velocidades de crecimiento bacteriano se modifican y por ende también la curva de crecimiento del microorganismo (Lin *et al.* 2000).

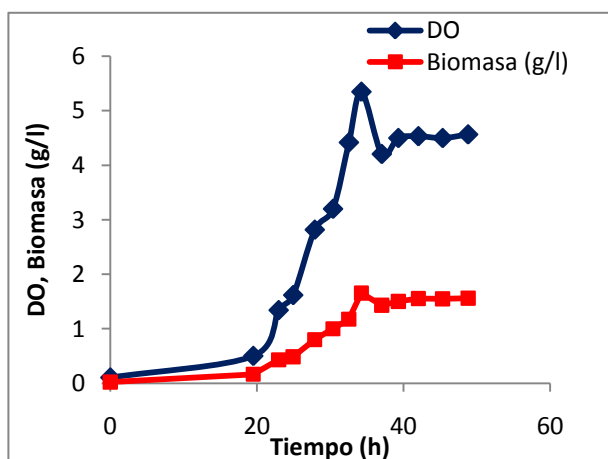
Una primera aproximación al comportamiento de un microorganismo bajo diferentes condiciones nutricionales es la realización de cultivos batch. Este sistema de cultivo ayuda a determinar parámetros cinéticos del crecimiento bacteriano que luego se deberán tener en cuenta para un correcto diseño de cultivos continuos posteriores. En vista de la necesidad de desarrollar un modelo de crecimiento para *G. diazotrophicus*, y debido a la carencia de datos bibliográficos de importancia sobre el crecimiento de este organismo utilizando sacarosa como única fuente de nitrógeno, es que este trabajo comienza con el estudio del comportamiento de *G. diazotrophicus* PAL 5 bajo determinadas condiciones nutricionales con el uso de sacarosa como fuente de carbono y energía, mediante el empleo de cultivos batch.

#### 3.1.1. Diferentes concentraciones iniciales de sacarosa.

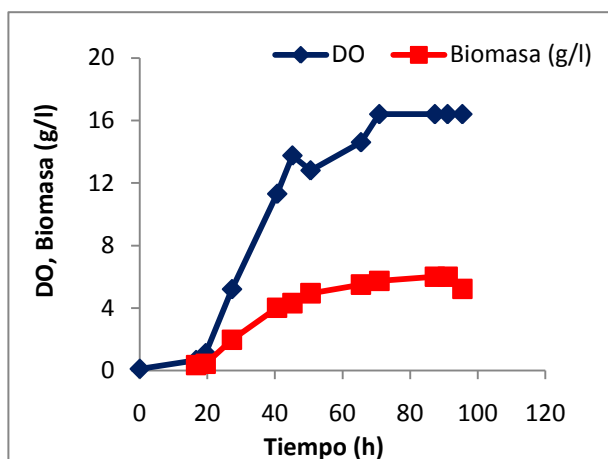
Como primer paso hacia la caracterización del crecimiento de *G. diazotrophicus* con sacarosa como única fuente de carbono se realizaron cultivos con diferentes concentraciones del azúcar. A estos cultivos se les midió DO (densidad óptica) y biomasa seca para estimar el crecimiento celular. En la grafica de la evolución de estos parámetros frente al tiempo transcurrido post-inoculación se observaron notables diferencias en cuanto a los valores numéricos que estos tomaron para todas las concentraciones de sacarosa ensayadas, pero sus comportamientos a lo largo del tiempo fueron semejantes (figura 9 y 10). El marcado incremento de la DO a lo largo del cultivo



comparado con el moderado aumento del peso seco se puede atribuir a la producción de polisacáridos extracelulares que interfirieron en la medida de absorbancia y condicionaron la utilización de este dato como un parámetro absoluto de la evaluación del crecimiento. No obstante esto, la medida de DO fue un parámetro utilizado para una estimación rápida del desarrollo del cultivo. Este comportamiento de la biomasa y la DO pudo trasladarse a otras condiciones de sacarosa estudiadas sin importar su concentración.



**Figura 9:** Biomasa (g/l) y DO vs tiempo (h). Cultivo batch con 10 g/l de sacarosa como fuente de carbono y energía y 3 g/l de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  como fuente de nitrógeno con pH controlado, pH = 6,0.



**Figura 10:** Biomasa (g/l) y DO vs tiempo (h). Cultivo batch con 100 g/l de sacarosa como fuente de carbono y energía y 3 g/l de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  como fuente de nitrógeno con pH controlado, pH = 6,0.

Observando las figuras 9 y 10 se puede ver que con sacarosa como fuente de carbono y energía no se observó el crecimiento bifásico reportado por Luna (2003), Attwood *et al.* (1991) y Flores-Encarnación *et al.* (1999) cuando este microorganismo crece utilizando glucosa. La fase de latencia se extendió hasta aproximadamente las 20 horas de iniciado el cultivo independientemente de la concentración de sacarosa. Sin embargo la fase de

crecimiento logarítmico se prolongó en el tiempo a medida que aumentó la concentración de sacarosa inicial.

En el caso de los cultivos con alta concentración de sacarosa se observó una fase de “crecimiento lento” luego de la etapa de crecimiento logarítmico. Esta etapa no se puede definir como una fase estacionaria ya que se obtuvo un aumento neto tanto de la biomasa como de la DO del cultivo, pero la velocidad de crecimiento fue marcadamente menor que en la fase de crecimiento logarítmico. En los puntos comprendidos entre las 20 y 50 horas de cultivo la velocidad media de crecimiento fue de 0,14 g biomasa/hora, mientras que desde las 50 horas hasta las 90 horas se obtuvo una velocidad de crecimiento promedio de 0,02 g biomasa/hora. Este comportamiento, comúnmente observado en el crecimiento microbiano en medios complejos, es adjudicado a que la progresiva aparición de diferentes sustratos limitantes del crecimiento con el tiempo (Monod, J. 1949, Lin *et al.* 2000). Sin embargo no se observó una segunda fase de latencia debida al reacondicionamiento metabólico para el consumo de ácido glucónico producido durante la etapa inicial del crecimiento, como se indica en la literatura para los cultivos con glucosa (Luna 2003, Attwood *et al.* 1991; Flores-Encarnación *et al.* 1999).

Comparando los valores de DO y/o biomasa máximos y los rendimientos de biomasa de los cultivos batch con las diferentes concentraciones de sacarosa evaluadas se obtuvieron los datos mostrados en la Tabla 1.

Valores máximos			
[sacarosa]	DO	biomasa (g/l)	rendimiento (g biomasa/g sacarosa)
10 g/l	4,53	1,55	0,16
20g/l	7,40	2,39	0,12
40 g/l	9,45	3,38	0,08
80 g/l	18,40	5,61	0,07
100 g/l	16,40	6,00	0,06
150 g/l	17,74	3,40	0,02

**Tabla 1:** Valores máximos de biomasa (g/l), DO y rendimiento (g biomasa/g sacarosa) para cultivos batch de *G. diazotrophicus* PAL 5 con control de pH frente a concentraciones variables de sacarosa y 3 g/l de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  como fuente de nitrógeno.

Realizado el cálculo del rendimiento máximo teórico, tal cual se indica en el ítem 1.3.1 de la introducción de este trabajo, la producción de biomasa con sacarosa como fuente de carbono es de 0,68 g de biomasa/g de sacarosa. Este valor es muy superior a los presentados en la tabla 1, principalmente porque sólo contempla la utilización de la sacarosa como fuente de carbono para la generación de biomasa. Esto es así porque, como veremos más adelante, el carbono aportado por la sacarosa fue destinado a generación de otros productos carbonados diferentes a la biomasa como polisacáridos, ácido glucónico, ceto-ácidos, además de la liberación de CO<sub>2</sub> (producto de la respiración celular). El descenso de los rendimientos celulares obtenidos frente al aumento de la concentración de sacarosa llevó a la conclusión que la producción de subproductos carbonados debió aumentar paralelamente a la concentración de fuente de carbono en el medio de cultivo, disminuyendo el aporte de la sacarosa a la biomasa. El decaimiento en el rendimiento entre los cultivos con 10 y 20 g/l de sacarosa, si bien significativo, no fue tan abrupto como en aquellos cultivos con concentraciones superiores. Se puede especular que en estas condiciones nutricionales, la sacarosa se presentó como el principal sustrato limitante del crecimiento microbiano, disponiendo de una proporción mayor de carbono hacia la producción de biomasa y no quedando carbono residual para la generación de subproductos.

En general los microorganismos heterótrofos presentan rendimientos en biomasa del orden de 0,4-0,5 g por g de azúcar consumido (Roels, 1983; Luttkik *et al.*, 1997; Luna *et al.*, 2000). Como se ve en la tabla 1, y como se verá a lo largo de este trabajo, los rendimientos obtenidos con *G. diazotrophicus* son significativamente inferiores a esos valores. Esta característica fisiológica de este organismo ya fue reportada por otros autores (Attwood *et al.* 1991, Luna *et al.* 2000) que adjudican este comportamiento a una muy baja eficiencia de producción de ATP por *G. diazotrophicus* en su cadena respiratoria lo que lo hace muy ineficiente en cuanto a la utilización de la fuente de carbono para la producción de biomasa.

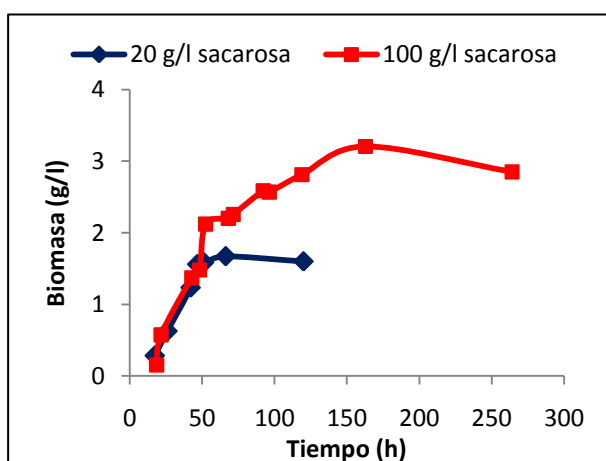
La diferencia numérica entre la DO y la biomasa fue más importante en el caso del cultivo con 150 g/l de sacarosa. Esto pudo deberse a que la absorbancia propia de los polisacáridos extracelulares (que se produjeron en todos los casos) generaron interferencias en la medida de DO de los cultivos. Pero además, en estos cultivos con elevadas concentraciones de sacarosa, cuando se realizaron las centrifugaciones de las muestras para la determinación de peso seco de biomasa, y debido a un aumento muy significativo de la viscosidad del medio por la presencia de polisacáridos, ocurrió una

pérdida de biomasa porque la misma posiblemente quedó retenida en el polisacárido y no fue totalmente separada del medio de cultivo. La medida de proteínas en la matriz del polisacárido sería una estrategia para ser utilizada en la evaluación de esta interferencia, sin embargo el uso de las metodologías actuales para cuantificar proteínas por colorimetría, generan resultados erróneos frente a muestras con altas concentraciones de hidratos de carbono ya que los azúcares se presentan como interferentes en estas técnicas. Por tanto, en todos los cultivos que presentaron una alta producción de polisacáridos seguramente se habrá subestimado la concentración de biomasa, pero, no habiendo métodos sencillos alternativos disponibles se utilizó esta medida para estimar el crecimiento microbiano.

Cuando se aumentó al doble la concentración de la fuente de carbono y energía, con un rendimiento celular similar, se debiera haber producido aproximadamente el doble de biomasa, si es que ningún otro nutriente del cultivo fuera limitante. Analizando los datos obtenidos al respecto (tabla 1) se vio que existió una limitación en un nutriente del medio de cultivo diferente a la fuente de carbono para concentraciones superiores a 40 g/l de sacarosa. A concentraciones mayores a 40 g/l de sacarosa, la limitación más significativa del crecimiento celular debiera corresponder a la fuente de nitrógeno ya que, si se realiza el cálculo de la máxima biomasa producible con la cantidad de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  agregada al medio de cultivo sólo es posible obtener alrededor de 5,30 g/l de biomasa. En los casos de mayor concentración de sacarosa este valor calculado fue levemente superado. Dado que *G. diazotrophicus* es un fijador de nitrógeno en vida libre, es posible que haya algún aporte de nitrógeno atmosférico a la biomasa. Sin embargo, para poder llevarse a cabo la FBN es necesaria una disponibilidad ambiental de  $\text{O}_2$  disminuida para que la nitrogenasa se pueda expresar. Esto pudo ocurrir, más allá de las concentraciones altas de oxígeno disuelto de los cultivos, porque las condiciones de microaerofilia necesarias para la FBN podrían darse por la activa producción del polisacárido extracelular que generó un cambio significativo de la viscosidad del medio y podría haber actuado como una barrera física dificultando la transferencia de oxígeno hasta la superficie celular. Este fenómeno también podría explicar el cambio en la pendiente de la curva de crecimiento observada en los cultivos con altas concentraciones de sacarosa descrito anteriormente.

### 3.1.2. FBN

Teniendo en cuenta los cambios observados por Alvarez y Martínez-Dretz (1995) y Tejera *et al.* (2004) en el crecimiento de *G. diazotrophicus* frente a diferentes fuentes de nitrógeno, y existiendo la posibilidad de manejar las condiciones operativas de los cultivos a fin de obtener las condiciones fenotípicas propias de la FBN en vida libre por este microorganismo, se realizaron cultivos variando la fuente de nitrógeno (FBN y NoFBN) en condiciones de limitación y no limitación en la fuente de carbono y energía, 20 g/l y 100 g/l de sacarosa respectivamente. El objetivo de estos cultivos fue el de conocer el perfil de crecimiento bajo condiciones de FBN en concentración de sacarosa limitante y no limitante y compararlo con los resultados obtenidos en condiciones de NoFBN. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 11 y 12 respectivamente.



**Figura 11:** Biomasa (g/l) vs tiempo (h) de cultivos batch con 20 g/l de sacarosa y 100 g/l de sacarosa en condiciones de FBN con pH controlado, pH = 6,0.

De las figuras 11 y 12 se observa que en condiciones de FBN la fase de latencia del cultivo se extendió hasta las 20 horas al igual que lo ocurrido en los cultivos batch con diferentes concentraciones iniciales de sacarosa y 3 g/l de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  como fuente de nitrógeno (NoFBN). Al aumentar la concentración de sacarosa en el cultivo la duración de la fase de crecimiento exponencial se prolongó en el tiempo. También se observó esta extensión temporal comparando los cultivos en condición de NoFBN y FBN con la misma concentración de sacarosa (figura 10 y 12), habiendo sido en estos últimos aproximadamente dos veces más extensa. Las condiciones de FBN no generaron una prolongación de la fase de latencia (donde el microorganismo debe sintetizar todo el “pool” proteico que le permitirá metabolizar, además de los nutrientes presentes en el medio de cultivo, el nitrógeno atmosférico), pero si aumentó la duración de la fase de

crecimiento logarítmico debido a un descenso en la velocidad de duplicación del microorganismo y en la velocidad de consumo de la fuente carbonada. Sin embargo no se logró obtener un rendimiento de biomasa semejante entre las condiciones de FBN y NoFBN con igual concentración de sacarosa. Es decir que bajo condiciones de FBN además, de haberse prolongado el cultivo en el tiempo, también se modificó significativamente la producción de biomasa.

Valores máximos en FBN		
[sacarosa]	biomasa (g/l)	rendimiento (g biomasa/g sacarosa)
20 g/l	1,58	0,079
100 g/l	3,20	0,032

**Tabla 2:** Valores máximos de biomasa (g/l), DO y rendimiento (g biomasa/g sacarosa) para cultivos batch de *G. diazotrophicus* PAL 5 en FBN, con control de pH.

Evaluando los valores máximos de rendimientos de biomasa presentados en la tabla 2, vemos una disminución del rendimiento en biomasa para los cultivos con 100 g/l de sacarosa respecto de los cultivos con 20 g/l de sacarosa. Esto era esperable dado que, como se dijo anteriormente, a concentraciones superiores a 20 g/l la sacarosa deja de ser el nutriente limitante del crecimiento, con lo cual -aún en condiciones de FBN- con una concentración inicial de 100 g/l de sacarosa el cultivo esta en exceso en la fuente de carbono. Es un hecho conocido que los microorganismos heterótrofos en tales condiciones son poco eficientes en la utilización de la fuente de carbono y energía mostrando rendimientos en biomasa muy inferiores a aquellos que se obtienen cuando la fuente de carbono está en defecto (Neijssel y Tempest, 1979; Neijssel *et al.*, 1996; Russell y Cook 1995).

Observando los rendimientos anteriormente mostrados, y comparándolos con los obtenidos en los cultivos con igual concentración de sacarosa pero en condiciones de NoFBN; se vio que el cambio nutricional con respecto a la disponibilidad del nitrógeno generó modificaciones notables en el crecimiento del microorganismo. La significativa disminución de los rendimientos en biomasa para el caso de los cultivos en condiciones de FBN comparados con aquellos realizados en condiciones de NoFBN (a la misma concentración de sacarosa) se puede explicar teniendo en cuenta que en condiciones de FBN a los microorganismos “les cuesta más” sintetizar biomasa. La FBN es un proceso energéticamente “caro”. Según la estequiometría del proceso de FBN (Dixon y Kahn

2004) por cada mol de nitrógeno atmosférico fijado a amonio se necesitan 16 moles de ATP. Este significativo costo energético genera un crecimiento microbiano más lento y menos eficiente. *G. diazotrophicus* utiliza la sacarosa en parte para la síntesis de biomasa y en parte para la generación de energía celular. Debido a un aumento en los requerimientos energéticos celulares, una proporción mayor de sacarosa debe ser destinada a generar energía reduciendo la disponibilidad de este disacárido para la producción de biomasa.

Luna *et al.* (2000 y 2002) mostraron que el rendimiento en biomasa no se veía afectado en condiciones de FBN respecto a condiciones de NoFBN en cultivos de *G. diazotrophicus* con glucosa como fuente de carbono y energía. Los rendimientos en ambos casos eran muy similares a pesar del alto costo energético de la FBN. Estos autores adjudicaron este hecho a que, en condiciones de FBN y con una GDH-PQQ activa, *G. diazotrophicus* modifica el transporte de electrones de la cadena respiratoria hacia una rama mejor acoplada. De esta forma la cadena respiratoria presenta una mayor relación P/O produciendo más ATP por mol de electrones transportados. Así se mejora la eficiencia energética de este organismo en estas condiciones y no se observan diferencias en rendimiento entre condiciones o no de FBN. Este comportamiento no parece tener lugar cuando, como en este trabajo, la fuente de carbono utilizada es sacarosa, al menos en cultivos batch.

Así *G. diazotrophicus* PAL 5 fue capaz de fijar nitrógeno en vida libre frente a dos condiciones de fuente de carbono limitantes y no limitantes. La condición de FBN no modificó la fase de latencia del microorganismo, pero la velocidad de crecimiento bacteriano se vio modificada por esta condición prolongando la fase de crecimiento logarítmico. También se vio un aumento en los requerimientos nutricionales celulares debido al costo energético que implica la FBN, produciendo una disminución en el rendimiento de biomasa frente a los obtenidos en condiciones de NoFBN con concentraciones de sacarosa comparables.

### 3.1.3. Diferentes fuentes de nitrógeno.

En las publicaciones realizadas por Tejera *et al.* (2004), donde ponen de manifiesto la influencia de la fuente nitrogenada en el metabolismo de *G. diazotrophicus*, enfatizan la importancia de la presencia de aminoácidos en el jugo apoplástico de la caña de azúcar, ambiente natural de *G. diazotrophicus* en vida endófito. La existencia de aminoácidos

en este ambiente sugiere una importante regulación del crecimiento bacteriano durante la asociación con la planta hospedante. Para entender la influencia nutricional de la fuente de nitrógeno se evaluó el crecimiento microbiano frente a condiciones variables de disponibilidad, calidad y cantidad de nitrógeno en el medio de cultivo.

Teniendo en cuenta los valores de rendimiento mostrados en la tabla 3, y comparando la biomasa obtenida con 3 g/l de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  como fuente de nitrógeno con los cultivos con extracto de levaduras y triptona, no se observaron diferencias altamente significativas. Esto último sugirió que un aumento en la calidad de la fuente de nitrógeno, entendiendo el término *calidad* como la disponibilidad de nitrógeno en forma de aminoácidos ya sintetizados por el agregado de fuentes nitrogenadas complejas como extracto de levaduras y triptona, no generó una modificación en el metabolismo de la sacarosa que tenga algún efecto en la producción de biomasa, al menos en condiciones donde la fuente de carbono y energía actúa como nutriente limitante. Por lo que, metabólicamente no se generaron inconvenientes para *G. diazotrophicus* en la utilización de fuentes de nitrógeno totalmente inorgánicas y el aporte de fuentes complejas de nitrógeno no le parece presentar ventajas metabólicas para la generación de biomasa.

Valores máximos para 20 g/l sacarosa.			
Fuente de N	DO	Biomasa (g/l)	rendimiento (g biomasa/g sac)
3 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	7,40	2,39	0,12
6 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	7,72	3,56	0,18
FBN	6,00	1,58	0,08
6 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + 1,5 g/l E.L.	8,50	4,35	0,22
1,5 g/l E.L. + 1,5 g/l triptona.	7,45	2,48	0,12

**Tabla 3:** Valores máximos obtenidos de biomasa (g/l), DO y rendimiento (g biomasa/g sacarosa) para cultivos batch de *G. diazotrophicus* PAL 5 con control de pH y fuente de nitrógeno variable. E.L.= extracto de levaduras

Es notable que la producción de biomasa en condición de FBN refleje un rendimiento muy disminuido demostrándose así el gasto energético que implica la FBN para las células, siendo la condición de FBN la que mostró el menor rendimiento en biomasa. Particularmente en presencia de nitrógeno inorgánico enriquecido con extracto de levaduras se observó un rendimiento en biomasa muy superior que en las otras



condiciones ensayadas. Cabe mencionar que en estos cultivos no se consumió totalmente el  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , sólo aproximadamente el 50% de dicho nutriente fue incorporado a la biomasa, situación esperable dado que esos cultivos estaban limitados en carbono. Probablemente parte de los esqueletos carbonados de los aminoácidos aportados por el extracto de levaduras fueron incorporados a la biomasa lo que explicaría su mayor concentración en los cultivos con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y extracto de levaduras.

Así se puede concluir que la utilización de una fuente de nitrógeno inorgánica, comparándola con fuentes de nitrógeno más elaboradas y de directa incorporación a la biomasa celular, no generó una dificultad metabólica y/o un gasto energético elevado para este microorganismo. Sin embargo Tejera *et al* (2004) mostraron un incremento muy significativo en el rendimiento en biomasa en cultivos de *G. diazotrophicus* en presencia de determinados aminoácidos en el medio de cultivo, cuando se utiliza una concentración más elevada de sacarosa.

### 3.1.4. Sin control de pH.

La ausencia de control de pH puede ocasionar un estrés ambiental para los microorganismos, principalmente cuando el desarrollo microbiano conlleva la modificación del pH externo por la producción de algún producto. Bajo estas circunstancias ambientales *G. diazotrophicus* presenta algún tipo de adaptación fenotípica debido a que se trata de un microorganismo ácido-tolerante que muestra capacidad de crecimiento y fijación de  $\text{N}_2$  a valores de pH entre 2,5 y 7,0 (Stephan *et al.* 1991, Burris 1994). En el año 2008 Luna *et al.* reportaron cómo el metabolismo de la glucosa, principal fuente de carbono y energía, y la FBN de *G. diazotrophicus* son modificados frente a valores de pH extremos (2,5-7,5).

Con el objeto de determinar si la falta de control de pH podría modificar el crecimiento de *G. diazotrophicus* en cultivos con sacarosa como fuente de carbono y energía, se realizaron cultivos sin el agregado automático de NaOH y/o  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ni agentes amortiguadores de la acidez en el medio de cultivo. En este ambiente debido a la generación de ácidos, principalmente ácido glucónico (Alvarez y Martínez-Dretz 1995, Attwood *et al.* 1991, Luna *et al* 2006 y 2008), se observó un descenso marcado en el pH del cultivo llegando a valores cercanos a 2,00 en las condiciones estudiadas.

Valores máximos sin control de pH				
[sacarosa]	f fuente de N	pH	biomasa (g/l)	rendimiento (g biomasa/g sacarosa)
20 g/l	3 g/l (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,64	0,85	0,043
	FBN	2,44	1,23	0,062
	1,5 g/l E.L. + 1,5 g/l triptona	3,50	1,54	0,077
100 g/l	3 g/l (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,43	0,84	0,008
	FBN	1,47	0,65	0,007
	1,5 g/l E.L. + 1,5 g/l triptona	1,98	1,23	0,012

**Tabla 4:** Valores máximos obtenidos de biomasa (g/l) y rendimiento (g biomasa/g sacarosa) para cultivos batch de *G. diazotrophicus* PAL 5 sin control de pH y fuente de nitrógeno y carbono y energía variables.

Existen varias reseñas bibliográficas que reportan el crecimiento de *G. diazotrophicus* a pH 3,5 en condiciones de cultivos continuos, presentando un alto requerimiento energético a causa de la expresión de un mecanismo de homeostasis citoplasmático dependiente de energía (Attwood *et al.* 1991; Stephan *et al.* 1991, Luna *et al.* 2008). En condiciones de acidez y observando los datos de la tabla 4, se vio una producción en biomasa muy inferior que aquella obtenida a pH controlado. En los cultivos con alta concentración de sacarosa los rendimientos en biomasa fueron menores a los cultivos con baja concentración del azúcar. Esto último se puede adjudicarse, aunque sea parcialmente, a que la producción de ácidos en los cultivos con 100 g/l de sacarosa fue mayor que en los cultivos con 20 g/l lo que condujo a un descenso mayor del pH ambiental.

En condiciones de acidez *G. diazotrophicus* mostró un consumo extra de la fuente de carbono y energía a medida que el valor de pH descendió, indicando un alto requerimiento energético para superar el gradiente de pH externo y mantener la homeostasis celular. Así, el bajo rendimiento presentado en cultivos batch sin control de pH frente a los cultivos con pH constante podría adjudicarse, aunque sea en parte, a un incremento en los requerimientos de mantenimiento celular de *G. diazotrophicus*.

Sin importar la condición de limitación en la fuente de carbono y energía, se observó que la presencia de una fuente de nitrógeno compleja, como es el caso de los cultivos

enriquecidos con extracto de levaduras y triptona, presentaron un mayor rendimiento de biomasa frente a las otras fuentes de nitrógeno. Principalmente el aporte de aminoácidos como asparagina, ácido aspártico, ácido glutámico, glutamina y triptófano incrementan hasta un 60% el crecimiento microbiano de *G. diazotrophicus* PAL 5 con respecto a  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  como única fuente de nitrógeno (Tejera *et al.* 2004). Además, en los cultivos enriquecidos en fuente de nitrógeno orgánico fue donde se observó un menor descenso del pH externo que en las otras condiciones nutricionales, lo que pudo contribuir a un mayor rendimiento celular en estas condiciones, dado que las células debieron insumir menor cantidad de energía para mantener el pH citoplasmático.

Concluyendo, *G. diazotrophicus* fue capaz de crecer y fijar nitrógeno en cultivos con concentraciones limitantes y no limitantes de sacarosa a valores de pH ácidos presentando rendimientos de biomasa disminuidos con respecto al crecimiento de este microorganismo a pH 6,00, debido seguramente al aumento de los requerimientos de mantenimiento celular. La producción de ácido glucónico, como se verá más adelante, fue el factor principal que modificó el pH del medio de cultivo durante el crecimiento celular, por lo que altas concentraciones de sacarosa implicaron altas producciones de ácido glucónico y una disminución del pH ambiental mayor. Fuentes de nitrógeno complejas implicaron un menor descenso en el pH externo y un rendimiento de biomasa mayor cuando se lo compara con las condiciones de FBN y de fuente de nitrógeno inorgánico.

### 3.2. Producción de ácido glucónico y ceto-ácidos en cultivos batch de *G. diazotrophicus* con sacarosa.

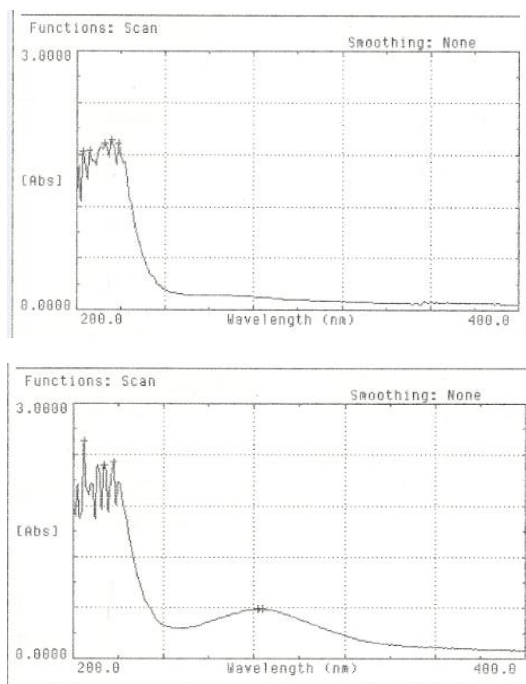
Una gran variedad de bacterias son capaces de producir ácido glucónico extracelularmente a partir de la glucosa. En la mayoría de estos microorganismos la conversión de glucosa a gluconato se produce en el espacio periplasmático por acción de una glucosa deshidrogenasa pirroloquinolina-quinona dependiente (GDH-PQQ). Luego de la oxidación incompleta de la glucosa a gluconato muchas bacterias pueden metabolizar este ácido por la ruta de Entner-Doudoroff o la ruta de las pentosas fosfato (Attwood *et al.* 1991). *G. diazotrophicus* es un microorganismo capaz de realizar esta oxidación incompleta de la glucosa anteriormente detallada (Galar *et al.* 1995). Luego de la producción de glucónico por una GDH-PQQ unida a membrana, *G. diazotrophicus* puede metabolizar este ácido por dos vías alternativas: 1) en el citoplasma por la vía de los fosfatos de pentosas y 2) en el espacio periplasmático por oxidaciones incompletas interviniendo una gluconato deshidrogenasa (GaDH) unida a membrana y produciendo ceto-ácidos extracelulares como ácidos 2-ceto glucónico, 5-ceto glucónico y, bajo ciertas condiciones, 2-5 diceto glucónico (Matsushita 2003).

#### 3.2.1. Detección de ácido glucónico y ceto-ácidos en sobrenadantes de cultivos batch.

Como se detalló en el Capítulo 2 (Materiales y Métodos) la concentración del ácido glucónico, producido en los cultivos batch de *G. diazotrophicus*, fue medido por HPLC. La falta de un método preciso de distinción entre el ácido glucónico y los ceto-ácidos producidos extracelularmente por este microorganismo (con el equipamientos disponible), nos llevó a desarrollar la metodología a emplear para poder detectar y diferenciar los dos tipos de analitos antes nombrados.

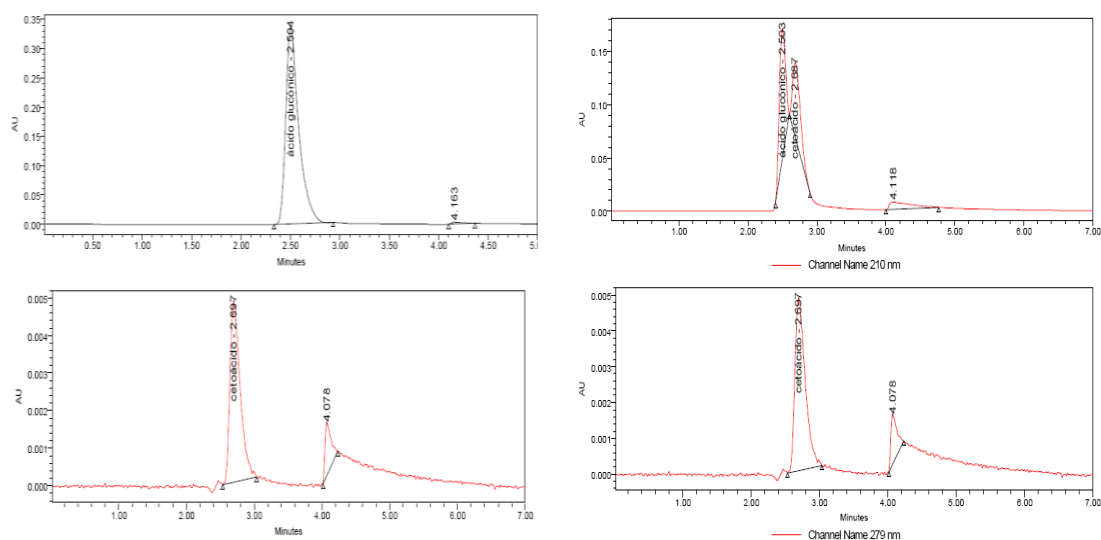
Realizando un espectrograma de soluciones puras de los dos patrones en igual concentración y mezclas apropiadas de ellas (figura 12), se determinaron dos longitudes de onda diferentes para irradiar la muestra y poder detectar por absorbancia los dos analitos de forma independiente. De esta forma, como se muestra en la figura 12, se distinguió un pico característico de los ceto-ácidos a 279 nm donde el ácido glucónico no genera interferencias, mientras que este se detectó a un  $\lambda = 210$  nm. En ambos casos mediante la utilización de patrones externos de gluconato de sodio y 5-ceto-gluconato

de potasio, por la comparación de las áreas de los picos obtenidos se procedió al cálculo respectivo de las concentraciones de estos analitos.



**Figura 12:** Espectro de absorción UV-visible (200 nm – 400 nm), y tabla de determinación de picos de absorción de: (A) ácido glucónico (5 g/l), (B) ácido 5-ceto-glucónico (5g/l).

Los picos observados a RT 4,163 y 4,078 (figura 13) corresponden al etanol que fue agregado a los patrones de gluconato y ceto-gluconato, ya que este solvente también fue agregado a las muestras de sobrenadantes de cultivo para precipitar tanto proteínas como polisacáridos (ver preparación de muestras en Materiales y Métodos).



**Figura 13:** Cromatogramas de HPLC: (A) patrón de ácido glucónico (5 g/l),  $\lambda = 210$  nm. (B) patrón de ceto-ácidos (5 g/l),  $\lambda = 279$  nm. (C1) ácido glucónico + ceto-ácidos (5g/l)  $\lambda = 210$  nm, (C2) ácido glucónico + ceto-ácidos (5g/l)  $\lambda = 279$ .

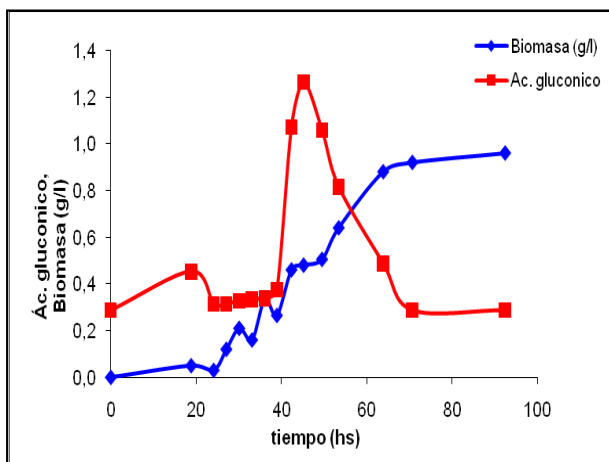
### 3.2.2. Producción de ácido glucónico y ceto-ácidos en cultivos batch con diferentes concentraciones iniciales de sacarosa.

Como se hizo referencia en el Capítulo 1, y como se documenta en la bibliografía, la determinación de la producción de ácido glucónico y ceto ácidos en cultivos de *G. diazotrophicus* es un complemento necesario para intentar comprender el comportamiento metabólico de este microorganismo. Es apropiado aclarar que en todas las publicaciones consultadas se utilizó glucosa como fuente de carbono y energía en los estudios experimentales realizados y analizados por diferentes autores (Alvarez y Martínez-Dretz, 1995; Stephan *et al.* 1991, Luna *et al.* 2008).

En publicaciones realizadas por Attwood *et al.* (2004) y Luna *et al.* (2003) se presentan perfiles de producción de ácido glucónico en cultivos batch con glucosa. En los mismos se muestra que la mayor parte del ácido producido se genera en las primeras etapas del crecimiento microbiano (fase de latencia y exponencial temprana) donde la glucosa es oxidada casi en su totalidad. Luego el crecimiento ocurre a expensas del consumo del ácido glucónico producido observándose, en algunas condiciones, producción de ceto-ácidos en la fase de crecimiento exponencial tardío. Este cambio en el consumo de la fuente de carbono y energía genera una diferencia en la velocidad de crecimiento de *G. diazotrophicus* mostrando una curva de crecimiento bifásica, marcada por una etapa inicial donde el crecimiento es principalmente a expensas de la oxidación parcial de la glucosa dando como resultado la producción de ácido glucónico. Luego, en una segunda etapa el crecimiento se lleva a cabo a partir del consumo del ácido glucónico antes generado. En ambas etapas, las oxidaciones parciales son efectuadas por enzimas unidas a la membrana interna de *G. diazotrophicus* que generan también poder reductor (GDH-PQQ y GaDH), el cual es luego convertido a energía celular a través de la cadena transportadora de electrones (Flores-Encarnación *et al.* 1999; González *et al.* 2006).

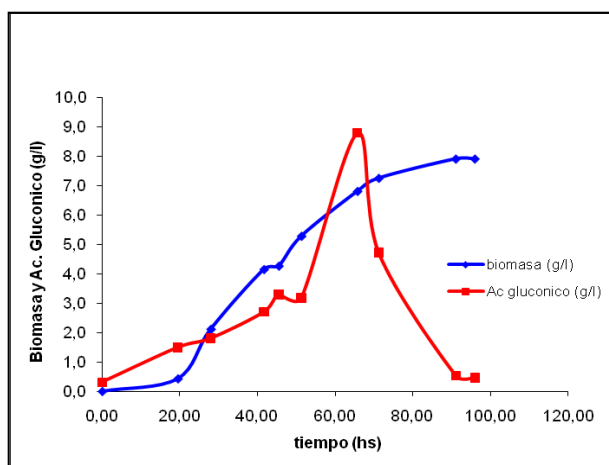
En el caso de los cultivos batch con sacarosa como fuente de carbono este cambio de sustratos carbonados no se registró, con lo cual no se observó un crecimiento bifásico. Sin embargo se obtuvo producción de ácido glucónico en todas las condiciones estudiadas, siendo este ácido orgánico el responsable principal del descenso del pH; aunque el rendimiento en la producción de ácido glucónico fue mucho menos importante que los presentados por los autores antes citados.

Graficando el perfil de crecimiento de *G. diazotrophicus* con respecto al tiempo y la producción de ácido glucónico (figura 14) se observó que el ácido glucónico fue producido durante la fase de crecimiento exponencial medio a tardío llegando a una acumulación de 1,4 g/l del ácido en el medio de cultivo.



**Figura 14:** Ácido glucónico (g/l) y biomasa (g/l) vs tiempo (h) de cultivo batch con 10 g/l de sacarosa como fuente de carbono y energía y 3 g/l de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  como fuente de nitrógeno con pH controlado, pH = 6,0.

Podemos asumir que un cultivo batch con 10 g/l de sacarosa puede ser comparable a un cultivo de iguales características con 5 g/l de glucosa, debido a que la fructosa liberada del disacárido no es utilizada como sustrato para la producción de ácido glucónico. En cultivos con 5 g/l de glucosa Luna *et al.* (2003) informan un rendimiento máximo de producción de ácido glucónico de aproximadamente 1,0 g ácido/g de glucosa consumida durante la primer fase de crecimiento (fase de latencia). Este valor es significativamente mayor al obtenido en nuestros cultivos con 10 g/l de sacarosa donde solo se obtuvieron 0,13 g de ácido/g de sacarosa. Por otro lado, en este cultivo no se observó producción de ceto-ácidos en ninguna etapa del crecimiento microbiano.



**Figura 15:** Ácido glucónico (g/l) y biomasa (g/l) vs tiempo (h) de cultivo batch con 100 g/l de sacarosa como fuente de carbono y energía y 3 g/l de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  como fuente de nitrógeno con pH controlado, pH = 6,0.

Igualmente, con concentraciones de sacarosa elevadas (100 g/l) y condiciones de NoFBN la producción de ácido glucónico a lo largo de cultivos de *G. diazotrophicus* mostró el mismo perfil de producción de ácido glucónico que en los cultivos limitados sin detectarse, en ningún momento, producción de ceto-ácidos. En este caso se obtuvo una concentración del orden de 9 g/l de ácido glucónico (figura 15).

Los resultados obtenidos demostraron producción de ácido glucónico en todas las concentraciones de sacarosa ensayadas, pero esta producción no fue detectada hasta tanto no existió glucosa libre en el medio, lo cual ocurrió sólo a expensas de una hidrólisis importante de la sacarosa. Hasta ese momento *G. diazotrophicus* creció usando la glucosa liberada por la LsdA y/o ácido glucónico pero sin la acumulación del ácido en el medio de cultivo por efecto, seguramente, de una velocidad de producción y consumo similares. Así se concluye que la presencia de sacarosa en el medio de cultivo no implica un cambio metabólico en la asimilación de este disacárido. La hidrólisis de la sacarosa por LsdA genera glucosa libre que luego es oxidada por la GDH-PQQ produciendo ácido glucónico. Sin embargo los niveles de acumulación de este ácido en los cultivos no fueron de una magnitud comparable a cuando *G. diazotrophicus* crece a expensas de glucosa como fuente de carbono y energía.

### 3.2.3. Producción de ácido glucónico y ceto-ácidos en cultivos batch con diferentes condiciones de fuente de nitrógeno.

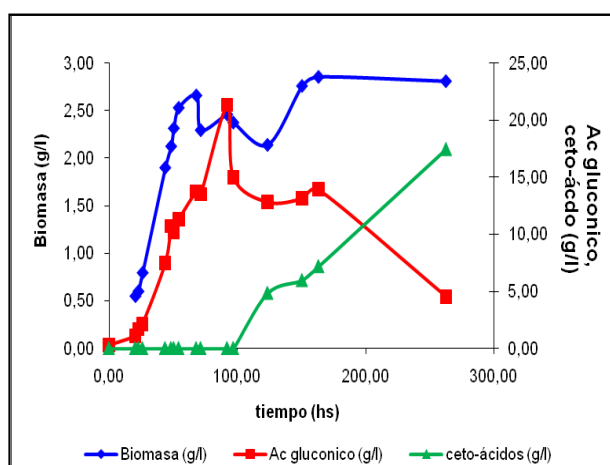
La oxidación incompleta de la glucosa vía la GDH-PQQ es la ruta metabólica propuesta como la principal para el catabolismo de la glucosa por *G. diazotrophicus*. Con el objetivo de estudiar la expresión de esta ruta en condiciones de variaciones en la disponibilidad de diferentes fuentes de nitrógeno analizamos la producción de ácido glucónico y ceto-ácidos en cultivos batch limitados y no limitados en la fuente de carbono (20 y 100 g/l respectivamente), variando la calidad y cantidad de fuente de nitrogenada.

En los casos de los cultivos batch limitados en fuente de carbono y energía (20 g/l de sacarosa) una producción activa de ácido glucónico se observó en los momentos finales de la fase de crecimiento exponencial del microorganismo, no registrándose una alteración de este comportamiento por variaciones en la fuente de nitrógeno. La concentración máxima obtenida para la limitación en carbono fue de 3 g/l de ácido glucónico sin producción de ceto-ácidos. Según lo reportado por Luna *et al.* (2003) la



producción de ácido glucónico llega a valores aproximados de 9 g/l de ácido glucónico en el medio de cultivo cuando *G. diazotrophicus* crece en presencia de 10 g/l de glucosa.

Contrariamente, en los casos de los cultivos batch con exceso de sacarosa (100 g/l) y donde la fuente de nitrógeno fue FBN o extracto de levaduras + triptona, la producción de ácido glucónico se vio afectada por la posterior oxidación de este producto hacia ceto-ácidos que fueron detectados en el medio de cultivo. Por tanto en estas condiciones se observó una ulterior oxidación del ácido glucónico en el espacio periplasmático acorde con lo propuesto por Matsushita (2003).



**Figura 16:** Ácido glucónico (g/l), ceto-ácidos y biomasa (g/l) vs tiempo (h) de cultivo batch con 100 g/l de sacarosa como fuente de carbono y energía y FBN con pH controlado, pH = 6,0.

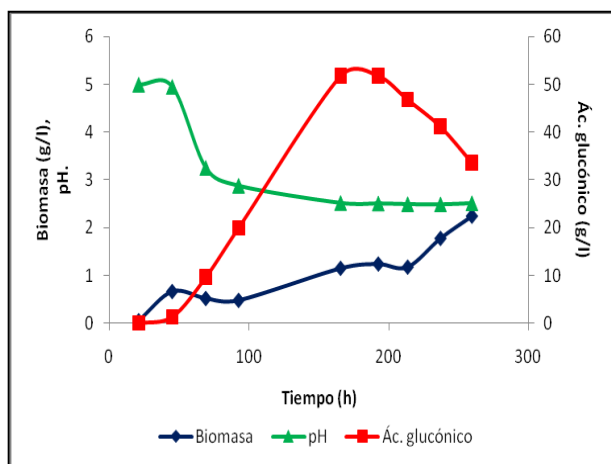
Observando la figura 16 se vio que la producción de ceto-ácidos ocurrió en la fase estacionaria del crecimiento bacteriano. El aumento en la concentración de ceto-ácidos fue contemporáneo al descenso en la concentración de ácido glucónico en el medio de cultivo. Además el consumo del ácido glucónico no implicó una modificación en la concentración de biomasa, por lo cual la producción de ceto-ácidos no parece estar ligada a la generación de energía para el crecimiento, aunque tal vez sea un aporte al mantenimiento celular. La producción de sustancias extracelulares no ligadas al crecimiento tiene lugar generalmente en los estadios finales de los cultivos bacterianos cuando los mismos están en condiciones de exceso de fuente de carbono (Roels, 1983).

### 3.2.4. Producción de ácido glucónico y ceto-ácidos en cultivos batch sin control de pH.

Para evaluar cómo se afecta el crecimiento de *G. diazotrophicus* frente a un descenso del pH, principalmente causado por la producción de ácido glucónico, se realizaron cultivos batch limitados y no limitados en sacarosa, variando la fuente de nitrógeno pero

sin el agregado de soluciones amortiguadoras y/o bases que mantengan el pH a un valor prefijado.

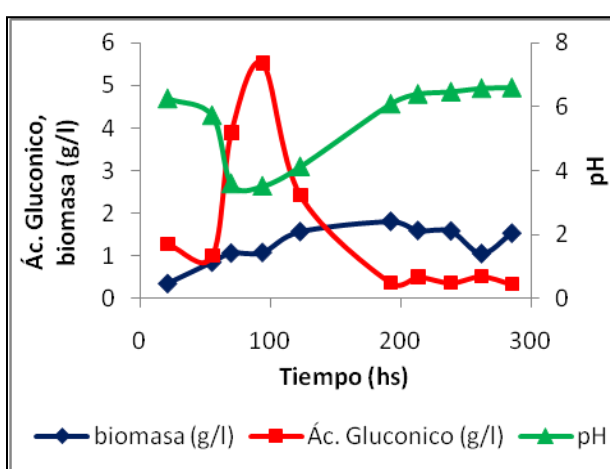
En estos casos el descenso de pH se produjo antes de las 20 h post-inoculación del cultivo, presentándose este comportamiento en todos los casos, siendo el descenso más abrupto en aquellos cultivos con 100 g/l de sacarosa provocado por una activa producción de ácido glucónico. Los valores de pH descendieron por debajo de 2,0 para los casos de los cultivos crecidos en FBN y 3 g/l de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , mientras que para el caso de los cultivos adicionados con extracto de levaduras y triptona no se computaron valores de pH por debajo de 3,0. Esto último puede deberse a el poder buffer de los aminoácidos presentes en las fuentes de nitrógeno complejas, aunque por su parte, cuando el  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  es ingresado a la célula aporta a la acidez del medio. En el caso de la FBN el descenso del pH puede deberse a un aumento en el flujo metabólico de la fuente de carbono y energía hacia la fosforilación oxidativa que produce un aumento en el poder reductor celular y aumenta la fuerza protón-motriz para la síntesis de ATP por la ATPasa. No obstante esto, tanto en condiciones de limitación como de no limitación de sacarosa, el medio de cultivo enriquecido con extracto de levaduras y triptona demostró una mayor producción de ácido glucónico, llegando a un rendimiento de 50% de conversión de la fuente de carbono en ácido glucónico para el caso de los cultivos con 100 g/l de sacarosa (figura 17).



**Figura 17:** Ácido glucónico (g/l), biomasa (g/l) y pH vs tiempo (h) de cultivo batch con 100 g/l de sacarosa como fuente de carbono y energía, con 1,5 g/l extracto de levaduras + 1,5 g/l triptona. Sin pH controlado.

Para una concentración de 100 g/l de sacarosa en el medio de cultivo el aporte de glucosa al medio podría alcanzar hasta 50 g/l (con un 100% de hidrólisis del disacárido). Teniendo en cuenta que se produjeron 50 g/l de ácido glucónico en los medios enriquecidos con fuentes de nitrógeno complejas, es válido pensar que el aporte de la glucosa al crecimiento bacteriano es fundamentalmente energético vía la oxidación

incompleta de este azúcar por la GDH-PQQ (con producción concomitante de PQQ reducido) y los esqueletos carbonados serían provistos mayoritariamente por los aminoácidos aportados por las fuentes de nitrógeno complejas. Aunque en estas condiciones metabólicas el crecimiento microbiano no fue significativo (figura 18) y, como se observó en apartados anteriores, se obtuvieron rendimientos en biomasa muy disminuidos con respecto a las otras condiciones ambientales. Como se observa en la figura 18, el descenso del pH tiene una relación directa con la producción de ácido glucónico ya que cuando el ácido comienza a ser metabolizado por el microorganismo, el valor de pH comienza a aumentar mostrando una nueva pendiente en la curva de crecimiento.



**Figura 18:** Ácido glucónico (g/l), biomasa (g/l) y pH vs tiempo (h) de cultivo batch con 20 g/l de sacarosa como fuente de carbono y energía, con 1,5 g/l extracto de levaduras + 1,5 g/l triptona. pH no controlado.

Las condiciones nutricionales más próximas a las que se enfrenta *G. diazotrophicus* dentro de su huésped, la caña de azúcar son las de los cultivos con 100 g/l de sacarosa y fuentes de nitrógeno complejas. Según estudios del contenido de jugo apoplástico de caña de azúcar (Tejera *et al.* 2004) la presencia de aminoácidos en los jugos internos de la planta y la interacción metabólica de *G. diazotrophicus* frente a estos, puede jugar un rol importante en la interacción simbiótica entre la caña de azúcar y este microorganismo endófito. Como puede verse, en estas condiciones se obtuvo una activa hidrólisis de sacarosa con la concomitante producción de ácido glucónico y un descenso moderado de pH (comparado con medios conteniendo otras fuentes nitrogenadas).

# Capítulo 4:

Cultivos continuos de *Gluconacetobacter diazotrophicus* con sacarosa como fuente de carbono y energía.



#### 4.1. Cultivos continuos y velocidades específicas.

Los procesos de fermentación son caracterizados por el crecimiento de un microorganismo que degrada los sustratos, formando biomasa y algún producto. Los balances de materia y energía del proceso son esenciales para el entendimiento y/o aplicación de los cultivos microbianos. Estos cálculos son una herramienta de la ingeniería metabólica y una determinación fundamental en estudios cuantitativos de la fisiología celular, ya que permiten organizar el conocimiento metabólico de un microorganismo en una red de reacciones bioquímicas y proveen una medida del grado de ajuste entre varias vías metabólicas (Varma y Palsson, 1994; Stephanopoulos *et al.*, 1998; Nielsen, 2001). Este grado de ajuste se ve modificado en función de perturbaciones ambientales, modificándose los flujos metabólicos de manera tal de mantener el balance de óxido-reducción en la célula (Soto-Cruz y Páez-Lerma, 2005).

Con base en los cálculos estequiométricos, y la especificación de algunas restricciones en el metabolismo, es posible calcular el rendimiento teórico máximo para la producción de un metabolito (Soto-Cruz y Páez-Lerma, 2005). De esta forma Jørgensen en el año 1995, pudo calcular el rendimiento teórico máximo de producción de penicilina a partir de glucosa para *Penicillium chrysogenum* en un medio complejo, bajo la suposición de ausencia de crecimiento, mientras que Causey (2004) realizó un estudio similar para la conversión de glucosa en piruvato por *Escherichia coli*.

La fijación biológica de nitrógeno es extremadamente sensible a la inactivación por O<sub>2</sub>, ya que la enzima responsable de la FBN (nitrogenasa) es inhibida por la presencia de este gas. Con lo cual la FBN y la presencia de oxígeno en un medio de cultivo parecieran ser incompatibles (Gallon, 1992). Frente a este problema las bacterias diazotróficas se adaptaron haciendo posible la FBN y la presencia de O<sub>2</sub> conjuntamente. Ellas desarrollaron un número de estrategias fenotípicas para limitar el contacto entre la nitrogenasa y el O<sub>2</sub> minimizando la pérdida de la habilidad para fijar nitrógeno (Gallon, 1981; 1992; Yates, 1987; Hill, 1988). Según el modelo propuesto por Gallon (1992) la fijación de nitrógeno es regulada por el nivel de actividad nitrogenasa y la síntesis de esta enzima. La actividad nitrogenasa de una célula requiere provisión de ATP y poder reductor. Esto, a su vez, depende del metabolismo general y de fenómenos como el transporte de membrana. El metabolismo puede influir en el grado de fijación de nitrógeno a través de la disponibilidad de esqueletos carbonados para la asimilación del

$\text{NH}_4^+$  generado (Gallon, 1992). Para el caso de *G. diazotrophicus*, Alvarez y Martínez-Dretz demostraron que este microorganismo metaboliza el  $\text{NH}_4^+$  generado por la FBN vía la glutamina sintetasa y glutamato sintetasa. Con lo cual, la disponibilidad de esqueletos carbonados a este nivel no tendría una implicancia directa sobre el metabolismo del carbono de este microorganismo. Por otro lado el flujo de electrones hacia el  $\text{O}_2$  es un potencial beneficio por la generación de ATP y la eliminación del  $\text{O}_2$  intracelular (Gallon, 1992).

Con el objetivo de caracterizar el comportamiento metabólico de *G. diazotrophicus* frente a diferentes estatus nutricionales, se llevaron a cabo C.C. en condiciones limitantes y no limitantes de fuente de carbono y energía (20 g/l y 100 g/l de sacarosa respectivamente). A su vez, se modificó la fuente de nitrógeno disponible generando condiciones de FBN (sin agregado de fuente nitrogenada y condiciones de microaerofilia) y condiciones de NoFBN (con 3g/l de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  en el medio de cultivo y  $\text{O}_2$  disuelto superior a 20% de saturación). Las condiciones de cultivo que se ensayaron fueron:

- 1) limitado en fuente de carbono y NoFBN (20 g/l de sacarosa + 3 g/l de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ );
- 2) limitado en fuente de carbono y FBN (20 g/l de sacarosa sin nitrógeno inorgánico);
- 3) no limitado en fuente de carbono y NoFBN (100 g/l de sacarosa + 3 g/l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ );
- 4) no limitado en fuente de carbono y FBN (100 g/l de sacarosa sin nitrógeno inorgánico).

Como se indicó en la introducción, todo C.C. se inicia con un cultivo batch. Para cada una de las condiciones nutricionales fueron generados cultivos batch en las mismas condiciones en las cuales se desarrollarían los C.C.. Luego de alcanzar la fase de crecimiento exponencial se comenzó la alimentación con medio fresco según lo dispuesto en Materiales y Métodos (Capítulo 2.1.4.). La velocidad de alimentación representó un factor de dilución (D) del orden de  $0,05 \pm 0,002 \text{ h}^{-1}$ . Esta velocidad de dilución fue seleccionada previamente a partir de la curva de crecimiento de los cultivos batch realizados en las mismas condiciones nutricionales en las cuales se desarrollaron los C.C.. En todos los casos se observó que las velocidades específicas máximas de crecimiento microbiano,  $\mu_{\text{max}}$ , fueron superiores a  $0,05 \text{ h}^{-1}$ , con lo cual, ajustando la velocidad de dilución en los cultivos a este valor, no se produciría el “lavado” de los mismos.

En todos los casos estudiados el cociente respiratorio, entendido este como la relación entre las velocidades de consumo de O<sub>2</sub> y de producción de CO<sub>2</sub> ( $r_{O_2}/r_{CO_2}$ ), tomó valores cercanos a 1 (tabla 5). De esta forma se muestra que el metabolismo de sacarosa por *G. diazotrophicus* es un proceso aeróbico, sin importar la condición de microaerofilia impuesta externamente y necesaria para la FBN.

Condición nutricional	Cociente respiratorio.
20 g/l sac. NoFBN	1,01 ± 0,03
20 g/l sac. FBN	1,20 ± 0,01
100 g/l sac. NoFBN	0,94 ± 0,04
100 g/l sac. FBN	1,04 ± 0,003

**Tabla 5:** Cocientes respiratorios obtenidos en C.C. de *G. diazotrophicus* durante el estado estacionario con variación en la concentración de fuente de carbono y energía y diferentes condiciones de fuente de nitrógeno. sac = sacarosa

Para confirmar que el crecimiento de *G. diazotrophicus* procedía realmente limitado en Carbono frente a una concentración de sacarosa de 20 g/l e independientemente de la fuente de nitrógeno empleada, una vez alcanzado el E.E., se disminuyó la concentración de sacarosa en el medio de alimentación, lo cual significó una disminución proporcional en la concentración de biomasa.

Observando los datos mostrados en la tabla 6 se determinó que, en los cultivos con 20 g/l de sacarosa, no existió una diferencia significativa en la producción de biomasa y en la velocidad específica de crecimiento microbiano frente a las diferentes fuentes de nitrógeno utilizadas. Este resultado corrobora que la principal limitación del crecimiento en esos cultivos fue la fuente de carbono y energía.

Condición nutricional	Biomasa (g/l)	$r_x$ (g/l.h)
20 g/l sac. NoFBN	2,01 ± 0,12	0,10 ± 4x10 <sup>-3</sup>
20 g/l sac. FBN	1,97 ± 0,02	0,10 ± 7x10 <sup>-7</sup>
100 g/l sac. NoFBN	8,24 ± 0,62	0,40 ± 2x10 <sup>-3</sup>
100 g/l sac. FBN	2,21 ± 0,03	0,11 ± 2x10 <sup>-3</sup>

**Tabla 6:** Biomasa (g/l), y velocidad de crecimiento  $r_x$  (g/l.h), en el E.E. de cada status nutricional ensayado. sac = sacarosa.

En los cultivos con 100 g/l de sacarosa la producción de biomasa y la velocidad de crecimiento mostraron una dependencia con respecto a la fuente de nitrógeno. En

condiciones de FBN se pudo observar una  $r_x$  muy inferior respecto a la condición de NoFBN, obteniéndose en FBN parámetros semejantes a la condición de limitación por carbono.

En la tabla 7 se muestran las velocidades de consumo de O<sub>2</sub>, producción de CO<sub>2</sub> y rendimiento de biomasa obtenidos en los diferentes EE estudiados.

Condición de cultivo	$q_{O_2}$ mmol O <sub>2</sub> / g.h	$q_{CO_2}$ mmol CO <sub>2</sub> /g.h	$y_{x/s}$ g/mol sac.
20 g/l sac. NoFBN	8,06 ± 0,09	8,15 ± 0,2	34,33 ± 2,12
20 g/l sac. FBN	9,74 ± 1,49	12,1 ± 1,6	33,69 ± 0,31
100 g/l sac. NoFBN	5,79 ± 1,08	5,43 ± 1	28,18 ± 2,13
100 g/l sac. FBN	8,27 ± 0,66.	8,45 ± 0,08	7,51 ± 0,13

**Tabla 7:** Velocidades específicas en E.E.:  $q_{O_2}$ , consumo de O<sub>2</sub> en milimoles de O<sub>2</sub> consumido / gramo de biomasa . hora;  $q_{CO_2}$ , formación de CO<sub>2</sub> en milimoles de CO<sub>2</sub> consumido / gramo de biomasa.hora;  $y_{x/s}$  rendimiento de biomasa en gramo de biomasa / mol de sacarosa. sac = sacarosa.

Los rendimientos en biomasa de los cultivos limitados en la fuente de carbono mostraron valores semejantes, sin importar la fuente de nitrógeno utilizada. Estos valores de rendimientos celulares son muy semejantes a los publicados por Luna (2003) en C.C. con glucosa como fuente de carbono y energía. Por tanto, en estos cultivos el costo energético de la FBN no se tradujo en una disminución del rendimiento celular, tal cual lo observado en los cultivos batch (Capítulo 3). Pareciera que en estos C.C. tuvo lugar el fenómeno reportado por Luna *et al.* (2000, 2002), quienes mostraron que condiciones de FBN (y con una GDH-PQQ activa) modifican el transporte de electrones en la cadena respiratoria de *G. diazotrophicus* aumentando la relación P/O (moles de ATP producidos por átomo gramo de O<sub>2</sub> consumido).

Los rendimientos de biomasa con diferentes concentraciones de fuente de carbono y energía resultaron inferiores en cultivos con exceso de fuente de carbono, siendo esta disminución muy significativa bajo condiciones de FBN aunque también fue obtenida en condiciones de NoFBN. Anteriormente se ha mencionado que los microorganismos heterótrofos son habitualmente ineficientes en condiciones de exceso de fuente de carbono y, particularmente, *G. diazotrophicus* es marcadamente ineficiente en la



incorporación de fuente de carbono a biomasa bajo toda condición de cultivo, (Roels, 1983; Luttkik *et al.*, 1997; Luna *et al.*, 2000). La caída abrupta del rendimiento, y el aumento en la producción de CO<sub>2</sub> en los cultivos con 100 g/l sacarosa y FBN, nos permite suponer que una proporción significativa de la fuente de carbono fue destinada a la producción de energía, sin descartar la posibilidad de la síntesis de otros productos extracelulares. Esto se pone en evidencia al observar los coeficientes estequiométricos del crecimiento microbiano y los balances de carbono que se detallarán más adelante en este mismo capítulo (apartado 4.3).

Las velocidades de consumo de O<sub>2</sub> y producción de CO<sub>2</sub> fueron mayores para los cultivos en FBN sin importar la concentración de sacarosa. Esta tasa respiratoria superior es compatible con el requerimiento de un mayor aporte energético para la FBN (Gallon, 1992; Attwood *et al.* 1991, Luna *et al* 2006 y 2008).

Resumiendo, *G. diazotrophicus* fue capaz de crecer y fijar nitrógeno en C.C., estableciéndose un E.E. para cada una de las condiciones nutricionales estudiadas. Los cocientes respiratorios obtenidos de los E.E. mostraron un metabolismo netamente aeróbico para este microorganismo, sin importar la concentración de la fuente de carbono y energía y la naturaleza de la fuente de nitrógeno. Se puede señalar que una concentración de 20 g/l de sacarosa generó una limitación en la fuente de carbono y energía sin importar la condición de FBN. Por su parte una concentración de 100 g/l de sacarosa fue una condición de exceso de carbono. De las velocidades de consumo de O<sub>2</sub>, producción de CO<sub>2</sub> y rendimiento de biomasa, se pudo establecer que la FBN genera un aumento en el flujo metabólico de *G. diazotrophicus* hacia la oxidación fosforilativa a nivel de sustrato. Esto se manifiesta con un aumento en el consumo de O<sub>2</sub> y producción de CO<sub>2</sub>, a expensas de una disminución de la producción de biomasa. Este último comportamiento fue aun más notorio en los cultivos no limitados en la fuente de carbono y energía, condición más cercana a la encontrada por este endófito en su ambiente natural, la caña de azúcar. Con lo cual, en el interior de caña de azúcar, *G. diazotrophicus* sería capaz de fijar nitrógeno aumentando sus requerimientos respiratorios a expensas su propio crecimiento.

## 4.2. Formación de productos en cultivos continuos.

*G. diazotrophicus* produce diferentes productos extracelulares que deben ser considerados en los estudios metabólicos del crecimiento de este microorganismo. Entre los posibles productos extracelulares que pueden ser encontrados en los sobrenadantes de cultivos de *G. diazotrophicus*, cuando éste microorganismo utiliza la sacarosa como fuente de carbono y energía, se destacan el ácido glucónico y ceto-ácidos, generados a partir de la oxidación incompleta de la glucosa (Alvarez y Martínez-Dretz, 1995; Attwood *et al.*, 1991; Luna *et al.*, 2006 y 2008), y diferentes levanos obtenidos mediante la polimerización de la fructosa resultante de la hidrólisis enzimática de la sacarosa vía la LsdA (Hernández *et al.*, 1995).

Por otro lado, existe una relación directa entre el metabolismo celular de *G. diazotrophicus* frente a la fuente de carbono y energía disponible y la condición de FBN que puede llevar a diferentes perfiles de producción de los metabolitos extracelulares, ya descritos por otros autores en *G. diazotrophicus* utilizando la glucosa como principal fuente de carbono y energía (Alvarez y Martínez-Dretz, 1995; Attwood *et al.*, 1991; Luna *et al.*, 2006 y 2008).

Mediante el empleo de C.C. se intentó determinar cómo se ven afectadas la producción de ácidos orgánicos y de levanos cuando *G. diazotrophicus* crece bajo diferentes condiciones de cultivo impuestas, tal como la limitación o el exceso de carbono ó FBN.

### 4.2.1. Formación de ácido glucónico y ceto-ácidos.

La producción de ácido orgánicos, a través del metabolismo de la glucosa, es una característica ya descrita en *G. diazotrophicus* (Alvarez y Martínez-Dretz, 1995, Attwood *et al.*, 1991; Luna *et al.*, 2006 y 2008). Estos productos son de importancia fisiológica, en la interacción de este microorganismo con su huésped, ya que esta bacteria se propone como responsable de la solubilización de fosfatos y zinc en la rizosfera de la planta que coloniza por la producción de ácido glucónico y sus ceto-ácidos derivados (Saravanan *et al.*, 2007; Intorne *et al.*, 2009).

En los C.C. limitados en la fuente de carbono y energía no pudo detectarse producción de ácido glucónico y/o ceto-ácidos (al menos con los métodos de cuantificación empleados). Tampoco se detectaron actividades enzimáticas relacionadas con la formación de estos productos, tanto GDH-PQQ como GaDH. Por lo que, en condiciones

de limitación por sacarosa *G. diazotrophicus* fue incapaz de producir extracelularmente ácido glucónico y/o ceto-ácidos, sin importar las fuentes de nitrógeno empleadas.

Por otro lado, en condiciones de exceso de sacarosa los C.C. mostraron acumulación de glucosa en el medio (que no superó los 4 g/l) y, en estas condiciones, se detectaron ácido glucónico y ceto-ácidos producidos vía la GDH-PQQ y GaDH periplasmáticas. Sin embargo, las actividades enzimáticas medidas en estos casos fueron muy inferiores a las publicadas en C.C. con glucosa como fuente de carbono y energía (Luna *et al.*, 2006). Esta diferencia puede atribuirse a que, en medios con sacarosa, la liberación de glucosa es controlada por la actividad hidrolítica de la levansacarasa (Cote y Ahlgran, 1993). Entonces, la baja concentración de glucosa libre en el medio de cultivo sería la causa de una baja expresión de GDH-PQQ.

En la tabla 8 se muestran las velocidades medias de producción de glucosa, ácido glucónico y sus respectivos rendimientos para los cultivos continuos con 100 g/l de sacarosa. Estos resultados mostraron que, las velocidades específicas de liberación de glucosa y el rendimiento de la producción de este monosacárido, presentaron una dependencia con respecto a la fuente de nitrógeno. Bajo condiciones de FBN se observaron mayores velocidades y rendimientos en la producción de glucosa que para la condición de NoFBN. Esto implicaría un aumento en la hidrólisis de la sacarosa hacia la generación de glucosa libre. De la misma forma la producción de ácido glucónico vía GDH-PQQ en FBN, registró un aumento significativo por un incremento en la velocidad específica de formación y en el rendimiento observado. Esto parecería indicar, como se expresó anteriormente, la existencia de una relación directa entre generación de glucosa libre y su ulterior oxidación a ácido glucónico.

Condición de cultivo	$q_{gluc}$ mmol gluc/g.h	$y_{gluc/sac}$ g gluc/mol sac.	$q_{ác}$ mmol ác/g.h	$y_{ác/sac}$ g ác/ mol sac
100 g/l sac. NoFBN	0,13 ±0,01	9,21 ±0,60	0,08 ±0,03	5,63 ±2,00
100 g/l sac. FBN	0,19 ±0,01	12,78 ±0,30	0,35 ±0,09	24,13 ±6

**Tabla 8:** Velocidades específicas de:  $q_{ác}$ , producción de ácido glucónico en mmoles de ácido glucónico/g de biomasa.hora;  $y_{ác/sac}$  rendimiento de producción d ácido glucónico en gramos de ácido glucónico/moles de sacarosa;  $q_{gluc}$ , liberación de glucosa en mmoles de glucosa/gramos de biomasa.hora;  $y_{gluc/sac}$  rendimiento de glucosa liberada en gramos de glucosa/mole de sacarosa, de cultivos continuos en estado estacionario.

Así se pudo determinar que la producción de ácido glucónico, y ceto-ácidos derivados de éste, y las actividades enzimáticas GDH-PQQ y GaDH dependen directamente de la condición de limitación de sacarosa y de la presencia de glucosa libre en el medio de cultivo, favoreciéndose la síntesis de estos productos en cultivos con exceso de sacarosa y FBN.

Analizando la demanda de poder reductor se obtiene que en condiciones de FBN ésta resulta más elevada que en NoFBN. Así, el aumento en la producción de glucosa y ácido glucónico observado para los cultivos en FBN implicó un incremento en la producción de poder reductor intracelular, en la generación de ATP y en la demanda de O<sub>2</sub>. Todos estos cambios metabólicos son coincidentes con la necesidad del microorganismo de proteger a la nitrogenasa y aportar la energía que el proceso de FBN requiere.

Cabe destacar que la concentración de sacarosa presente en el fluido apoplástico de caña de azúcar es cercana a los 100 g/l, por lo que es posible que los resultados obtenidos en condiciones de exceso de sacarosa se asemejen al comportamiento natural de *G. diazotrophicus* en el interior del vegetal hospedante, donde se presentan las condiciones ambientales de fuente de carbono y energía para un FBN eficiente.

Bajo los resultados obtenidos en los C.C. limitados en sacarosa, la ausencia de actividades oxidativas periplasmáticas de GDH-PQQ y GaDH, resultan de interés para posteriores análisis. Es llamativo que estos resultados sean opuestos a lo reportado en la literatura en cultivos con glucosa (Alvarez y Martínez-Dretz, 1995, Attwood *et al.*, 1991; Luna *et al.*, 2006 y 2008), por lo que se propone a futuro evaluar la regulación de la síntesis y expresión génica de estas dos enzimas mediante tecnologías moleculares.

#### 4.2.2. Producción de FOS y levanos.

En 1995 Hernández aisló y caracterizó la enzima responsable de la producción de fructanos en *G. diazotrophicus*, la levansacarasa (LsdA). Esta enzima utiliza la sacarosa presente en el medio de cultivo para la síntesis extracelular de fructanos. Sin embargo la función de estos productos extracelulares en la interacción planta-bacteria y/o en el metabolismo bacteriano y vegetal no es clara. Ha sido propuesto que los polisacáridos actuarían como una barrera física de protección de la nitrogenasa a la inhibición por O<sub>2</sub> (Gallon 1992). Se ha descrito que ciertas bacterias diazotróficas son rodeadas por polisacáridos capsulares, como *Dexia gummosa* (Hill, 1971) y *Gloeothece* (Rippka *et*

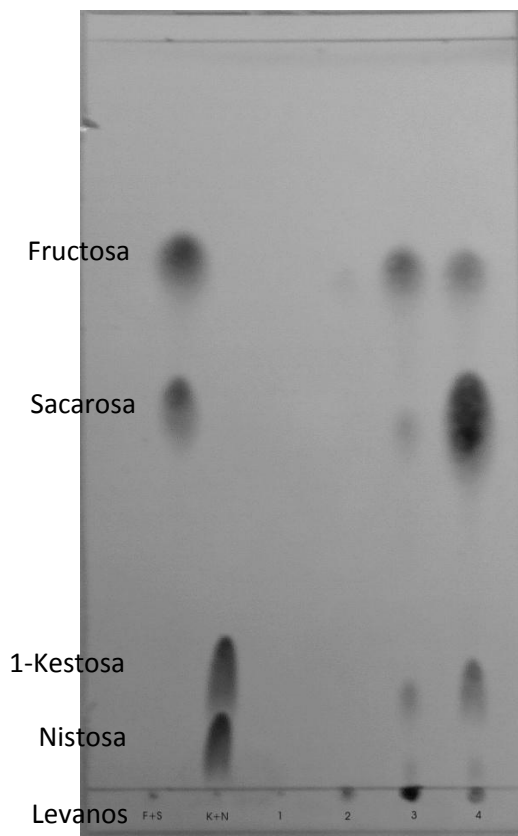
al., 1979). Estos polisacáridos pueden limitar la difusión de O<sub>2</sub>, favoreciendo la FBN sin afectar al metabolismo de carbono para la generación de ATP.

Hernández *et al.* (1995) observó síntesis de LsdA en todas las condiciones de cultivo ensayadas, por lo que concluyó que se trata de una enzima constitutiva. En los C.C. llevados a cabo en nuestro estudio, hemos observado la síntesis de LsdA en todas las condiciones nutricionales ensayadas. Sin embargo, la actividad específica de LsdA en los sobrenadantes de los C.C. fue mayor en aquellos con 100 g/l de sacarosa y FBN, mientras que los cultivos con 100 g/l de sacarosa y NoFBN presentaron una menor actividad específica (tabla 9). Con respecto a los cultivos limitados en carbono, estos presentaron actividades intermedias, siendo la más elevada la del cultivo con 20 g/l de sacarosa y FBN. Esto nos permitió inferir que la condición de FBN favorece la síntesis de LsdA, siendo mayor en los casos de exceso de fuente de carbono y energía.

Condición de cultivo	Actividad LsdA (UE/g biomasa)
20 g/l sac.NoFBN	30 ± 13
20 g/l sac.FBN	54 ± 25
100 g/l sac.NoFBN	24 ± 5
100 g/l sac.FBN	105 ± 18

**Tabla 9:** Actividad específica de LsdA (UE/g biomasa) obtenida en sobrenadantes de cultivos continuos durante el estado estacionario. sac = sacarosa.

Como se muestra en los resultados de TLC de la figura 19, en los C.C. limitados en sacarosa no se pudo detectar una producción significativa de FOS en ninguna de las dos condiciones de fuente de nitrógeno. En los cultivos limitados en carbono y FBN se pudo observar una pequeña acumulación de levanos en el sobrenadante del cultivo que se comprueba en los datos de la tabla 10. Asimismo no se pudo observar sacarosa y fructosa libre en el medio de cultivo (figura 19, calles 1 y 2), con lo cual nuevamente se verifica la condición de limitación en fuente de carbono y energía en los cultivos con 20 g/l de sacarosa.



**Figura 19:** TLC de cultivos continuos. F+S: patrón de fructosa + sacarosa (5 g/l), K+N: patrón de 1-kestosa + nistosa (5 g/l). 1: sobrenadante de C.C. con 20 g/l de sacarosa y NoFBN; 2: sobrenadante de C.C. con 20 g/l y FBN; 3: sobrenadante de C.C. con 100 g/l de sacarosa y NoFBN; 4: sobrenadante de C.C. con 100 g/l de sacarosa y FBN.

En el caso de los cultivos con exceso de sacarosa la producción de FOS fue notoria, acumulándose principalmente 1-kestosa. La condición de FBN fue la de mayor producción de FOS generando, de manera concomitante una alta cantidad de fructosa libre, mientras que en la condición de NoFBN se favorece la producción de levanos (tabla 10). Es necesario señalar que en estos cultivos no se metabolizó completamente la sacarosa, ya que se pudo detectar este disacárido en los sobrenadantes (sin superar los 10 g/l). Por tanto, los cultivos de 100 g/l de sacarosa se desarrollaron en exceso de la fuente de carbono y energía. Esta condición de exceso de sacarosa implicó la producción de FOS y levanos, sin importar la fuente de nitrógeno utilizada. Cabe destacar que la condición de NoFBN llevó a una producción mayoritaria de levanos mientras que la condición de FBN generó una producción predominante de FOS y fructosa libre.

Condición de cultivo	Levanos (g/l)
20 g/l sac. NoFBN	1,42 ± 0,08
20 g/l sac. FBN	5,96 ± 0,78
100 g/l sac. NoFBN	8,21 ± 1,48
100 g/l sac. FBN	4,86 ± 1,53

**Tabla 10:** Concentración de levanos (g/l) producidos por *G. diazotrophicus* en cultivos continuos frente a diferentes condiciones nutricionales. sac = sacarosa.

De los resultados obtenidos frente a la producción de fructanos y la síntesis de LsdA en los C.C., pudimos concluir que *G. diazotrophicus* fue capaz de expresar LsdA y producir fructanos en todas las condiciones ensayadas en línea con lo propuesto por Hernández *et al.* (1995). En los casos de C.C. en FBN la síntesis de LsdA fue mayor frente a la condiciones de NoFBN, sin embargo una mayor actividad enzimática no significó una mayor producción de levanos.

Pudimos detectar condiciones nutricionales que favorecieron diferencialmente la producción de levanos y FOS. Los cultivos con 100 g/l de sacarosa y NoFBN fueron los cultivos que presentaron una mayor producción de levanos mientras que los cultivos con mayor producción de FOS fueron los de 100 g/l de sacarosa y FBN. Así mismo, la condición de 20 g/l de sacarosa y FBN refleja un mayor porcentaje de conversión de sacarosa a levanos, alcanzando valores cercanos al 30 %, mientras que la condición de 100 g/l de sacarosa y NoFBN solo llega a convertir el 8%. Mas no obstante esto, es claro que una estrategia de C.C. no es industrialmente aplicable por los bajos rendimientos de producción en masa de levanos.

### 4.3. Estequiometría de crecimiento.

Entre las estrategias fisiológicas y bioquímicas para la protección de la nitrogenasa frente a su inhibición por O<sub>2</sub> se propone el aumento del consumo metabólico de O<sub>2</sub>. Algunas reacciones metabólicas que implican un descenso en la concentración de O<sub>2</sub> en el ambiente bacteriano podrían, en teoría, facilitar la FBN. En adición, la respiración genera ATP. Consistente con una necesidad de sostener la fosforilación oxidativa en orden a las necesidades de la FBN, algunos diazotrofos responden a condiciones de limitación de O<sub>2</sub> produciendo una oxidasa terminal de alta afinidad (Gallon 1992). Además, en ciertos diazotrofos como *Azotobacter*, se ha demostrado que la respiración y el consumo de O<sub>2</sub> tienen un rol específico en la protección de la nitrogenasa de la inactivación por O<sub>2</sub>, independiente de cualquier rol en la generación de ATP. En este caso se incrementa significativamente el consumo de O<sub>2</sub>, pero no se genera concomitantemente ATP por un desacople de la cadena respiratoria, (Luttik *et al.*, 1997; Luna *et al.*, 2000).

La determinación de la estequiometría del crecimiento de *G diazotrophicus* frente a sacarosa como fuente de carbono y energía nos ayudará a determinar el comportamiento metabólico de este microorganismo frente a la FBN.

Para realizar los balances de carbono y energía de estos cultivos necesitamos el cálculo de los parámetros estequiométricos para todos los elementos que intervienen en la ecuación química que caracterizaría a la producción de biomasa en estos C.C. Estos coeficientes son calculados a partir de las velocidades y rendimientos de consumo de sustratos y producción de productos, que se resumen en la tabla 11.

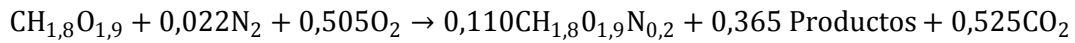
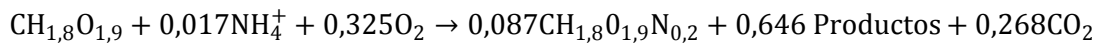
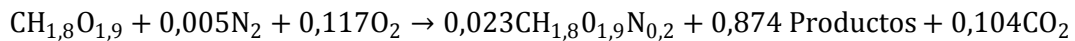
Parámetros cinéticos  Condiciones de cultivo	20 g/l sacarosa		100 g/l sacarosa	
	NoFBN	FBN	NoFBN	FBN
$r_x$ (g/l.h)	0,10	0,10	0,40	0,11
$r_S$ (g/l.h)	1,05	1,05	5,21	5,42
$r_{O_2}$ (g/l.h)	0,49	0,53	1,69	0,63
$r_{CO_2}$ (g/l.h)	0,68	0,86	2,18	0,88
$r_{levanos}$ (g/l.h)	0,07	0,29	0,40	0,24



$r_{\text{ácido gluconico}} \text{ (g/l.h)}$	0,00	0,00	0,08	0,35
$r_{\text{glucosa}} \text{ (g/l.h)}$	0,00	0,00	0,13	0,19
$y_{\frac{x}{s}} \text{ (g/g)}$	0,097	0,096	0,076	0,020
$y_{\text{CO}_2/s} \text{ (g/g)}$	0,648	0,820	0,417	0,162
$y_{\frac{\text{levanos}}{s}} \text{ (g/g)}$	0,069	0,280	0,076	0,044
$y_{\frac{\text{glucosa}}{s}} \text{ (g/g)}$	0,00	0,00	0,025	0,034
$y_{\frac{\text{ácido gluconico}}{s}} \text{ (g/g)}$	0,00	0,00	0,015	0,065
<b>a</b>	0,022	0,022	0,017	0,005
<b>b</b>	0,469	0,505	0,325	0,117
$y_{\frac{x}{s}} \text{ (c-mol/c-mol)}$	0,111	0,110	0,087	0,023
$y_{\text{CO}_2/s} \text{ (c-mol/c-mol)}$	0,415	0,525	0,268	0,104
$y_{\frac{\text{levanos}}{s}} \text{ (c-mol/c-mol)}$	0,065	0,263	0,071	0,042
$y_{\frac{\text{glucosa}}{s}} \text{ (c-mol/c-mol)}$	0,000	0,000	0,023	0,032
$y_{\frac{\text{ácido gluconico}}{s}} \text{ (c-mol/c-mol)}$	0,000	0,000	0,013	0,053
<b>B.C. (balance de carbon)</b>	0,593	0,904	0,463	0,256
$y_{\frac{p}{f_s}}^{\text{estimado}} \text{ (c-mol/c-mol)}$	0,474	0,365	0,646	0,874

**Tabla 11:** Parámetros cinéticos y rendimientos obtenidos de los C.C. en: limitación en fuente de carbono y energía (20 g/l de sacarosa) y no limitación en sacarosa (100 g/l), en fijación biológica de nitrógeno (FBN) y en presencia de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (NoFBN).

Teniendo en cuenta los balances elementales de carbono y energía para estos cultivos queda demostrada la existencia de productos del metabolismo que no pudieron ser medidos. Generando un parámetro cinético que englobe a todos los productos denominándolo  $y_{\frac{p}{f_s}}^{\text{estimado}}$ , se obtuvieron las siguientes relaciones estequiométricas:

20 g/l sacarosa NoFBN20 g/l sacarosa FBN100 g/l sacarosa NoFBN100 g/l sacarosa FBN

De las relaciones obtenidas se puede observar que en los cultivos limitados en fuente de carbono y energía se obtuvieron coeficientes comparables para la generación de biomasa para ambas fuentes de nitrógeno.

Existió una demanda de oxígeno mayor y un descenso en la síntesis de productos extracelulares para los cultivos en FBN limitados en sacarosa. Sin embargo la producción de CO<sub>2</sub> se vio incrementada para los cultivos en FBN lo cual demuestra un aumento en el flujo metabólico hacia la oxidación de sustratos y la producción de ATP. A concentraciones subóptimas de O<sub>2</sub> un leve aumento del nutriente estimula la FBN incrementando la provisión de ATP (Flores-Encarnación *et al.*, 1999; Luna *et al.*, 2002 y 2006).

En los cultivos con 100 g/l de sacarosa no se consumió totalmente la fuente de carbono como se mostró en la figura 9. Sin embargo no se llegó a acumular más de 10 g/l del disacárido en el medio de cultivo (dato no mostrado). Bajo estas consideraciones los rendimientos calculados para estos C.C., donde se supone un consumo total de la sacarosa, fueron subestimados así como también la síntesis de productos desconocidos mediante el cálculo del  $y_{p/s}^{estimado}$ . No obstante esto, los errores cometidos son poco significativos y los rendimientos calculados válidos para la comparación entre las

diferentes condiciones de cultivo y las conclusiones fisiológicas que de ellos se pudieron obtener.

Así, los cultivos no limitados en sacarosa (100 g/l) mostraron una producción de biomasa inferior en FBN respecto a la NoFBN. Esto también se tradujo en una demanda menor de fuente de nitrógeno y de O<sub>2</sub>. Sin embargo la síntesis de productos extracelulares fue altamente estimulada.

Comparando los cultivos limitados en sacarosa frente a lo no limitados se observó una disminución muy importante en la formación de biomasa para los no limitados así como también la producción de CO<sub>2</sub>. Consecuentemente el carbono aportado por la sacarosa debió ser dirigido a la formación de otros productos como se vio en el aumento abrupto de los coeficientes estequiométricos de la formación de estos. La baja demanda de O<sub>2</sub> y la poca producción de CO<sub>2</sub> presentados en los cultivos con 100 g/l de sacarosa, suponen que el metabolismo celular se vio dirigido hacia la síntesis de productos de estados de oxidación similares al de la sacarosa.

Resumiendo, en los C.C. de *G. diazotrophicus* en condiciones de FBN, se observó un aumento en la demanda de O<sub>2</sub> para aquellos cultivos limitados en carbono; y una mayor formación de productos, principalmente levanos, ácido glucónico y sus derivados, para los cultivos no limitados en sacarosa. Estas variaciones resultaron entonces, acordes con lo expresado por varios autores para la protección de la nitrogenasa (Flores-Encarnación *et al.*, 1999; Ureta y Nordlund, 2002; Pan y Vessey, 2001; Ramos y Roson, 1985; Yates, 1987; Gallon, 1992).

#### 4.4. Proteómica.

El genoma de *G. diazotrophicus* está disponible en bancos de datos públicos (número de acceso NC 010125), ya se han publicado estudios preliminares del proteoma asociado. A través del análisis de distribución de las 3778 ORFs anotadas en las diferentes categorías funcionales se puede verificar que 867 corresponden a proteínas de funciones desconocidas (Lery *et al.*, 2008b). Del gran número de proteínas identificadas algunas participan en procesos que ocurren a nivel extracelular responsables de diferentes funciones tales como proteasas, hidrolasas, resistencia múltiple a drogas y bacteriocinas (Piñón *et al.*, 2002; Martínez-Fleites *et al.*, 2005; Le Roy *et al.*, 2007). Estas funciones están asociadas a la actividad metabólica que se desarrolla fundamentalmente en el espacio periplasmático y su expresión está directamente relacionada con respuestas al ambiente y a la síntesis de sustancias de interés biotecnológico, como la producción de levansacarasa y fructanos (Hernández *et al.*, 1995; Hernández *et al.*, 2000).

A partir del estudio exploratorio del perfil proteico expresado en células de *G. diazotrophicus* fueron identificadas 583 proteínas correspondientes a diversas categorías funcionales mientras 88 proteínas expresadas corresponderían a proteínas desconocidas o conservadas cuya función es aún incierta (Lery *et al.*, 2008a). Los resultados obtenidos del estudio comparativo del proteoma de *G. diazotrophicus* durante una curva de crecimiento (cultivo batch) corresponden a un conjunto de proteínas codificadas en el genoma de esa bacteria que pueden ser expresadas de acuerdo al estado fisiológico de las células en tres fases muy marcadas de la curva de crecimiento; y a las alteraciones del medio durante su cultivo en exceso o limitación de N (Lery *et al.*, 2008b).

Cuando se realizan estudios de fisiología de microorganismos para evaluar la influencia de factores nutricionales, sobre un determinado fenotipo se utilizan generalmente cultivos batch. Por la propia naturaleza del sistema se observan generalmente respuestas múltiples, que son resultantes del propio metabolismo celular en respuesta a las variaciones cuali-cuantitativas del ambiente en función del tiempo. Esto imposibilita determinar las respuestas del sistema al cambio de una variable única y determinada. Una alternativa al uso de cultivos batch es la utilización de cultivos continuos mostrando como ventaja operativa la obtención de estados estacionarios ante la modificación una única variable nutricional del sistema (concentración y naturaleza de los nutrientes). De esta forma, se puede determinar la respuesta fenotípica del

microorganismo a la modificación de dicha variable mostrando una mejor aproximación al sistema biológico natural.

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente se intentó estudiar comparativamente el proteoma de membrana y el secretoma (proteínas extracelulares) de *G. diazotrophicus* en C.C. y diferentes estatus nutricionales. Bajo este objetivo, el primer paso fue la generación de las muestras a ser estudiadas por electroforesis 2D. Esto nos llevo a la necesidad de estudiar diferentes metodologías para la extracción de proteínas tanto de células como del material extracelular presentes en el medio de cultivo.

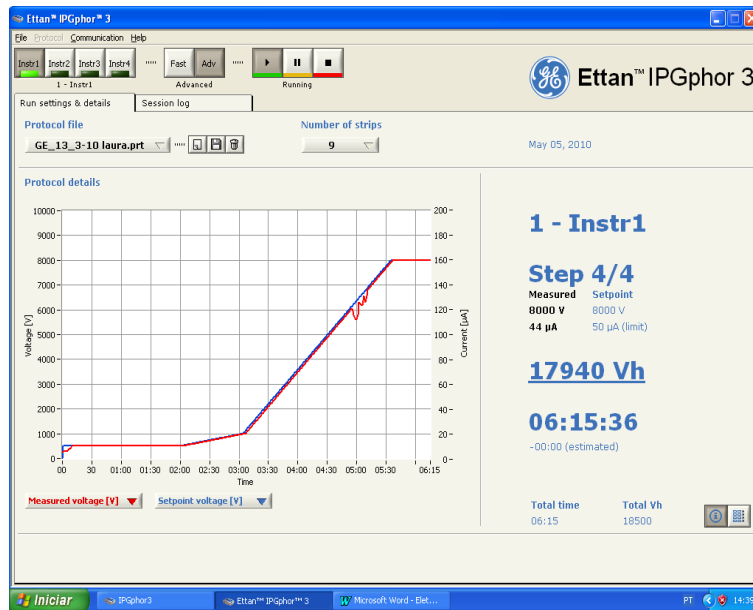
#### 4.4.1. Selección de la preparación de muestra.

Existen diferentes estrategias para la extracción de material proteico de células bacterianas (Polati *et al.* 2009, He y Wang 2008). Sin embargo la utilización de una estrategia apropiada para la obtención de las proteínas celulares es crucial para el análisis del perfil proteico bacteriano por electroforesis 2D.

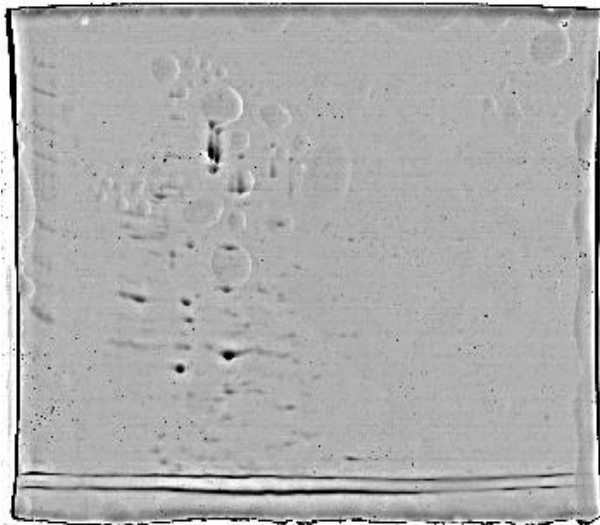
##### 4.4.1.1. Células.

Se realizaron 3 tipos de preparación de la muestra según lo que se detalla en el Capítulo 2 (Materiales y Métodos). La concentración de sales totales en el medio de cultivo es muy elevada, pudiendo estas interferir con el IEF y no permitir obtener el potencial eléctrico que se necesita para llevar a cabo este paso de la electroforesis 2D (2-D Electrophoresis principles and methods). Viendo el perfil del IEF del material proteico obtenido de las células bacterianas (figura 20) se vio que las proteínas fueron extraídas de forma eficiente sin rastros de posibles interferentes en el IEF.

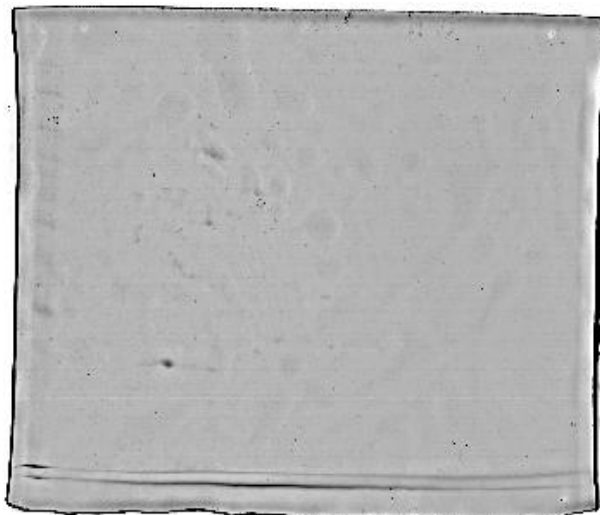
Luego del IEF, y como se detalla en Materiales y Métodos, se realizó un SDS-PAGE para las diferentes estrategias de preparación de la muestras (figura 21-23).



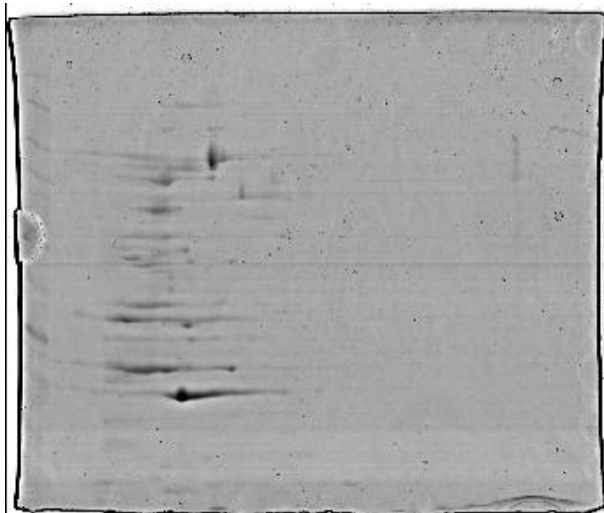
**Figura 20:** Perfil de la IEF finalizada. La línea azul es el comportamiento de voltaje del programa original y la línea roja el comportamiento de voltaje de la muestra.



**Figura 21:** Electroforesis 2D de células sonicadas sin tratamiento para la extracción de proteínas. Muestra del C.C. de *G. diazotrophicus* PAL 5 wt con 100 g/l de sacarosa y 3 g/l de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  con control de pH.



**Figura 22:** Electroforesis 2D de células sonicadas tratadas con CTAB para la extracción de proteínas. Muestra del C.C. de *G. diazotrophicus* PAL 5 wt con 100 g/l de sacarosa y 3 g/l de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  con control de pH.



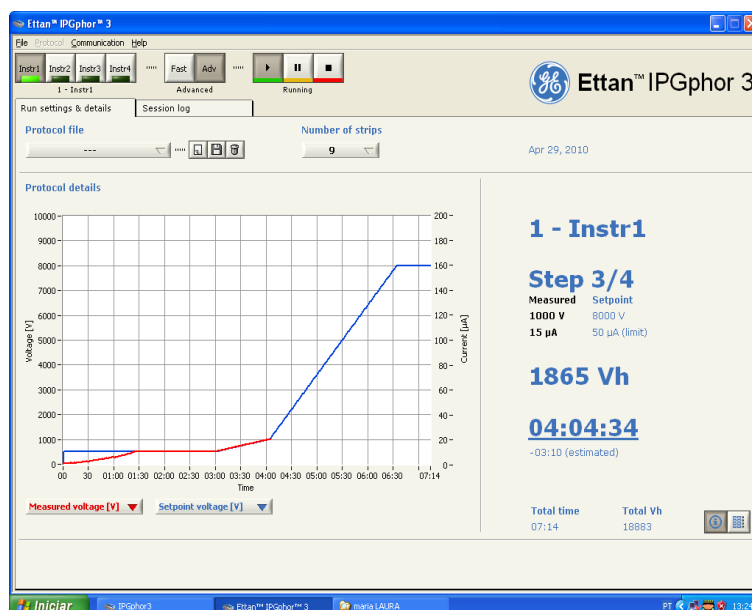
**Figura 23:** Electroforesis 2D de células sonicadas tratadas con TCA para la extracción de proteínas. Muestra del C.C. de *G. diazotrophicus* PAL 5 wt con 100 g/l de sacarosa y 3 g/l de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  con control de pH.

En estos ensayos preliminares se pudo evaluar que la mejor condición para la obtención de proteínas celulares de *G. diazotrophicus* creciendo en C.C. con alta concentración de sacarosa y nitrógeno inorgánico fue la sonicación de las células sin posterior extracción química de las proteínas. En esta estrategia (figura 21) se observan los “spots” claramente y se genera efecto de cola de los mismos por presencia de interferentes como puede ser los polisacáridos propios de *G. diazotrophicus* creciendo en estas condiciones (como se muestra en el caso de la figura 32). Además, la extracción fue sumamente eficiente ya que se detectaron una gran cantidad de “spots”, mientras que en el caso de la extracción con CTAB la extracción fue muy ineficiente con la pérdida significativa de las proteínas.

#### 4.4.1.2. Sobrenadantes.

Igualmente que para las células, los sobrenadantes fueron tratados por 3 tipos de preparación de la muestra según lo que se detalla en Materiales y Métodos. La concentración de sales totales en el medio de cultivo es muy elevada siendo en este material donde se observa una mayor interferencia con el IEF y no permitiendo obtener el potencial eléctrico que se necesita para llevar a cabo este paso de la electroforesis 2D (2-D Electrophoresis principles and methods). En el caso de los sobrenadantes solo fue aceptable el IEF de las muestras dializadas. La alta concentración salina del medio no

pudo ser eliminada por las otras estrategias de purificación de proteínas, por lo cual no se pudo llevar a cabo el IEF en forma eficiente.

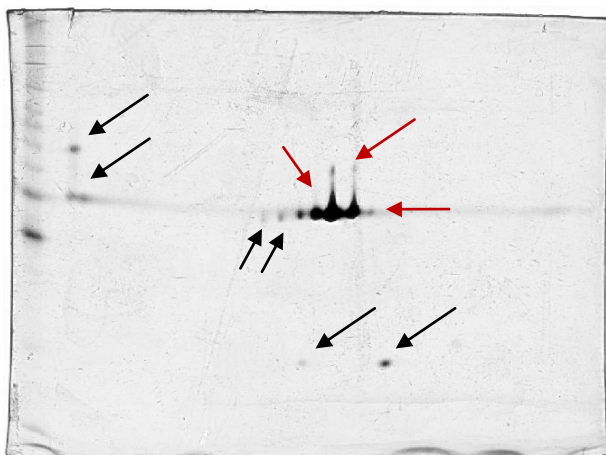


**Figura 24:** Perfil de la IEF en el paso 3. La línea azul es el comportamiento de voltaje del programa original y la línea roja el comportamiento de voltaje de la muestra.

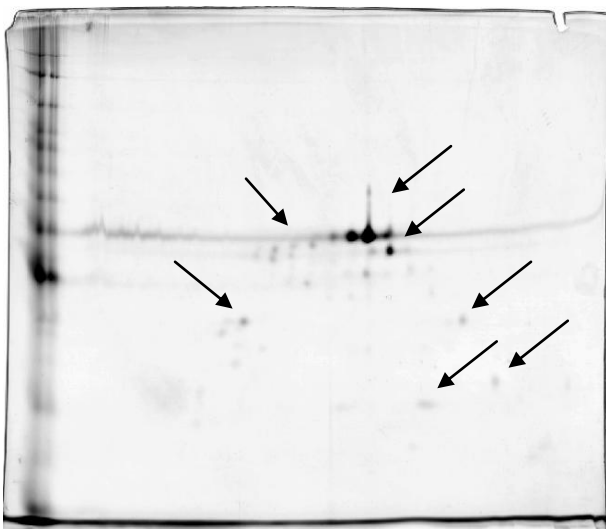
Viendo el perfil del IEF del material proteico obtenido de las células bacterianas (Figura 24) se vio que las proteínas fueron extraídas de forma eficiente sin rastros de sales del medio de cultivo en el IEF. Igualmente se observó un aumento paulatino del voltaje en el primer paso de la IEF, seguramente retrasado por la cantidad de sales en la muestra que imposibilita mantener los  $\mu\text{A}$  por debajo de 50 (valor límite) según los controlado por el software Ettan IPGphor 3. Pero como el primer paso del IEF fue alargado se ve que llega al voltaje de consigna antes de las 2 horas de corrida y el IEF se llevo a cabo de forma exitosa.

Luego del IEF, y como se detalla en Materiales y Métodos, se realizó un SDS-PAGE para los sobrenadantes dializados en las diferentes condiciones nutricionales de los C.C. (figuras 25-27).

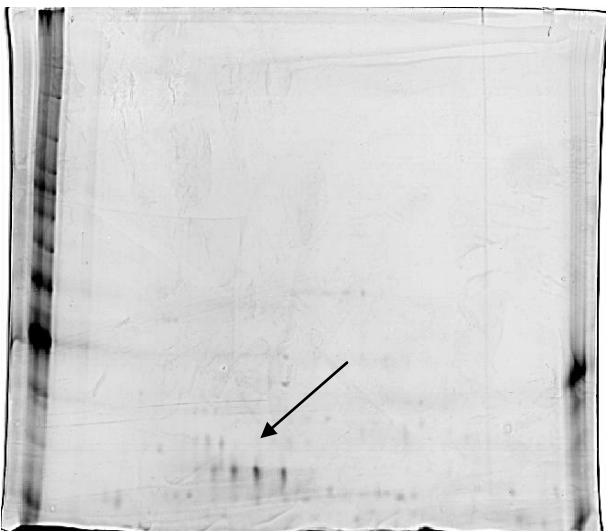




**Figura 25:** Electroforesis 2D de sobrenadante dializado de C.C. de *G. diazotrophicus* PAL 5 wt con 20 g/l de sacarosa y 3 g/l de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .



**Figura 26:** Electroforesis 2D de sobrenadante dializado de C.C. de *G. diazotrophicus* PAL 5 wt con 20 g/l de sacarosa y FBN.



**Figura 27:** Electroforesis 2D de sobrenadante dializado de C.C. de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL 5 wt con 100 g/l de sacarosa y 3 g/l de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

Las electroforesis 2D correspondientes, mostradas en las figuras 25 y 26, muestran el perfil del exoproteoma de *G. diazotrophicus* creciendo en C.C. con 20 g/l de sacarosa y diferentes fuentes de nitrógeno. Este organismo mostró un secretoma dependiente de la fuente de nitrógeno ya que se pudieron visualizar diferentes proteínas en la condición de

NoFBN y en la FBN. Además también se observaron diferentes concentraciones de algunas proteínas que se mantuvieron expresadas. Según lo caracterizado por Hernández *et al.* (1999), dentro del grupo de proteínas señaladas con flechas rojas, que contienen un peso molecular de 60 KDa puede encontrarse la LsdA.

Comparativamente los sobrenadantes de cultivos con 100 g/l de sacarosa presentaron un secretoma muy diferente (figura 27). En estos sobrenadantes no hemos podido visualizar un “spot” con peso molecular de 60 KDa que correspondería a la LsdA (Hernandez *et al.* 1999), sin embargo se han podido ver un grupo de proteínas de bajo peso molecular que no fueron expresadas en los cultivos limitados en carbono. Existe la posibilidad de que la LsdA quede retenida en el polisacárido que genera y así, mediante la eliminación del polisacárido del sobrenadante del cultivo por precipitación con etanol hayamos eliminado, conjuntamente la levansacarasa. Esto fue más significativo en los cultivos con 100 g/l de sacarosa que en los cultivos con 20 g/l de sacarosa por la concentración de levanos producidos y consecuentemente precipitados en la estrategia de extracción proteica. Se propone evaluar la existencia de la LsdA en los polisacáridos precipitados por intermedio de un inmuno-ensayo dirigido contra LsdA. También se propone evaluar otras estrategias de extracción proteica que no requieran la precipitación alcohólica de los polisacáridos.

#### 4.4.2. MALDI-TOF.

En el caso de las proteínas marcadas con flechas rojas en las figuras 25 y 26, expresadas tanto en condiciones de FBN como de NoFBN se encontraron en un peso molecular aproximado de 60 kDa. alguna de estas proteínas puede ser la LsdA según con lo caracterizado por Hernández (1999). Para evaluar esta posibilidad y la posible existencia de isoenzimas de la levansacarasa, estos spots fueron analizados por MALDI-TOF.

Según lo analizado en el MALDI-TOF y lo evaluado en banco de datos (figura 28), estas proteínas corresponden únicamente a la LsdA, con lo cual los diferentes spot encontrados correspondieron a isoenzimas de la LsdA que se caracterizan por poseer un punto isoeléctrico diferente.

[gi|162146301](#) **Mass:** 63486 **Score:** 156 **Expect:** 7.6e-10 **Matches:** 13

levansucrase precursor protein [Gluconacetobacter diazotrophicus PA1 5]

**Figura 28:** Resultados obtenidos del análisis bioinformáticas de lo obtenido por MALDI-TOF.

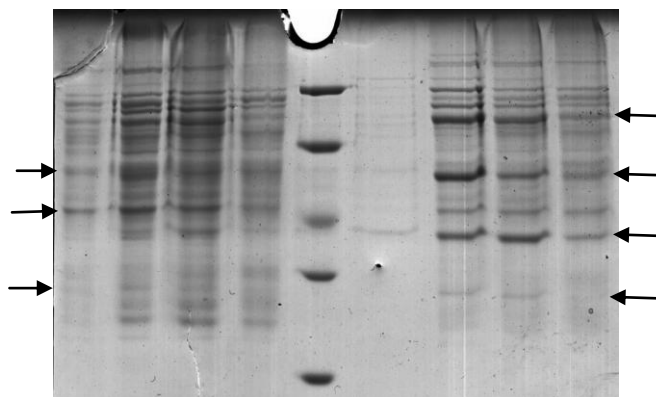
Así hemos podido establecer la expresión extracelular diferencial de *G. diazotrophicus* dependiendo de la concentración de sacarosa en el medio de cultivo y de la condición de FBN y No FBN. También hemos obtenido evidencia de isoenzimas de la LsdA que no están indicadas en la bibliografía.

#### 4.4.3. Proteínas de membrana.

La existencia de varios datos bibliográficos sobre cambios en el metabolismo y comportamiento energético de *G. diazotrophicus* frente a perturbaciones nutricionales (Aguilar *et al.*, 1999; González *et al.*, 2006; Gómez-Manzo *et al.*, 2008; Tejera *et al.*, 2004) nos llevo a tetar de dilucidar el perfil proteico de las membranas de este microorganismo durante los cultivos continuos estudiados. Estas adaptaciones bacterianas ante los cambios nutricionales, sobre todo ante la condición de FBN, involucran principalmente proteínas de membrana como las proteínas pertenecientes al sistema respiratorio de *G. diazotrophicus* (Aguilar *et al.*, 1999; González *et al.*, 2006) así como también proteínas involucradas en el metabolismo del carbono como GDH y GaDH y otras deshidrogenasa (Alvarez y Martínez-Dretz, 1995, Attwood *et al.*, 1991, Luna *et a.,l* 2006 y 2008). Es por estas razones que el estudio de la expresión de proteínas de membrana externa e interna es relevante para detallar el comportamiento metabólico de *G. diazotrophicus* ante la FBN y diferentes disponibilidades de fuente de carbono y energía.

Realizando un SDS-PAGE de proteínas de membranas extraídas de *G. diazotrophicus* en los diferentes estados estacionarios de los cultivos continuos evaluados en este capítulo obtuvimos SDS-PAGE mostrado en la figura 29. A través de este estudio se pudo ver diferentes perfiles proteicos, tanto de membrana interna como de membrana externa presentado por *G. diazotrophicus* durante los diferentes EE estudiados. Con lo cual, como se señala en la figura, los cultivos limitados en fuente de carbono y energía

comparándolos con los cultivos no limitados, mostraron perfiles proteicos semejantes pero con diferentes intensidades, lo que indicó un grado de expresión proteica determinada por la abundancia de la fuente de carbono y energía. Así mismo, *G. diazotrophicus* presentó diferentes perfiles proteicos entre las condiciones de FBN y NoFBN, destacándose también una diferencia en el grado de expresión de varias proteínas, principalmente de membrana externa.



**Figura 29:** SDS-PAGE de proteínas de membrana de C.C. de *G. diazotrophicus* PAL 5. Calles 1-4 proteínas de membrana interna, 1: 20 g/l de sacarosa + NoFBN, 2: 20 g/l de sacarosa + FBN, 3: 100 g/l de sacarosa + NoFBN, 4: 100 g/l de sacarosa + FBN. 5: patrón de peso molecular. Calles 6-9 proteínas de membrana externa, 6: 20 g/l de sacarosa + NoFBN, 7: 20 g/l de sacarosa + FBN, 8: 100 g/l de sacarosa + NoFBN, 9: 20 g/l de sacarosa + FBN.

Es claro destacar que estos estudios sólo significaron un acercamiento no acabado del sistema de membrana que presenta *G. diazotrophicus* frente a las perturbaciones nutricionales estudiadas. Se propone realizar un estudio más detallado de estos perfiles proteicos con el uso de detección de las proteínas diferenciales por medio de MALDI-TOF, como se utilizó en la comparación de los secretomas mostrados en este mismo capítulo.

# Capítulo 5:

Producción de FOS y levanos por  
*Gluconacetobacter diazotrophicus*.



## 5.1. Introducción.

Los polisacáridos son ingredientes alimenticios funcionales que poseen un gran potencial para ser incluidos en la manufacturación de muchos alimentos. En adición, y debido a sus características fisicoquímicas, muchos de estos azúcares poseen propiedades que son beneficiosas para la salud de quienes los consumen. Estas incluyen la no cariogenicidad, bajo valor calórico y la habilidad de estimular el crecimiento de bifidobacterias en el colon (Crittenden y Payne, 1996).

Oligosacáridos de varios tipos son encontrados en la naturaleza como componentes de vegetales, frutas y lácteos. Durante la década de los 80 su popularidad como ingredientes alimenticios creció mucho, particularmente en Japón y Europa. Su principal importancia está dada por los posibles beneficios a la salud del consumidor que se le atribuyen a estos polisacáridos. En 1991, el gobierno japonés legisló el uso específico de alimentos benéficos para la salud publicando un listado de estos compuesto (FOSHU), entre los que se encuentran polisacáridos de fructosa, galactosa, jugo de soja y palatinosa. Ese mismo año más de 450 productos fueron manufacturados utilizando polisacáridos como ingredientes alimenticios (Crittenden y Payne, 1996).

De todos los productos introducidos en esta tendencia alimenticia, los fructanos derivados de la sacarosa son los que atraen mayor atención debido a la expansión del mercado del azúcar. Además, su producción en masa no es complicada y el sabor dulce que poseen es muy similar al sabor tradicional del azúcar comercial (Yun, 1996; Sangeetha *et al.*, 2005).

Las enzimas responsables de la síntesis de fructanos se pueden dividir en dos clases: una originaria de plantas como el espárrago, la remolacha, el hinojo, el alcaucil de Jerusalén, entre otros; y la otra donde la fuente enzimática proviene de bacterias y hongos como *Aspergillus sp.*, *Aureobasidium sp.*, *Arthrobacter sp.*, *Fusarium sp.*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Gluconacetobacter xilinum*, *Zimomonas mobilis*, *Bacillus subtilis*, entre otros microorganismos (Sangeetha *et al.*, 2005). Por otra parte la producción de fructanos utilizando enzimas vegetales no posee un buen rendimiento, por lo que actualmente se prefieren enzimas originarias de microorganismos (Crittenden y Playne, 1996; Yun, 1996; Slavin, 1999, Sangeetha *et al.*, 2005).

Recientes desarrollos en la enzimología industrial han posibilitado la producción a gran escala de fructanos. Esto generó la industrialización de este proceso que puede ser

dividido en dos tipos: el primero es un sistema batch usando enzimas solubles y el restante es un sistema continuo utilizando enzimas o células inmovilizadas (Yun, 1996).

## 5.2. Producción de levanos en sistema batch libre de células.

Los levanos son un tipo de fructanos constituidos por unidades de fructosa unidas por enlaces  $\beta$  (2-6) que superan las 10 unidades pudiendo llegar hasta las  $10^6$  unidades del azúcar formando una cadena polimérica lineal. En muchos casos a estos fructanos se los encasilla dentro de los polisacáridos no digeribles por la flora gastrointestinal humana. Estas moléculas de carbohidratos pueden ser extraídas de fuentes naturales o pueden ser producidas de forma química por hidrólisis de polisacáridos de mayor peso molecular, o por síntesis química o enzimática a partir de disacáridos como la sacarosa.

Son solubles en agua y su poder edulcorante depende de la estructura química y el grado de polimerización. (Crittenden y Playne, 1996; Voragen, 1998). Acorde con Roberfroid y Slavin (2000) el dulzor decrece con el aumento en el grado de polimerización del polisacárido, por lo que en el caso de los levanos no poseerían un significativo poder edulcorante. De todas formas, los levanos poseen importantes propiedades fisicoquímicas que promueven su uso como ingredientes alimenticios. Una de las características más utilizadas es la incapacidad de los microorganismos de degradarlos, aun por las bacterias alojadas en el colon. Consecuentemente, la producción de ácidos y poliglucanos microbianos por las bacterias de la boca no ocurre, así los levanos son edulcorantes no criogénicos, pudiendo sustituir a la sacarosa en la producción de goma de mascar, yogures y bebidas (Mussatto y Mancilha, 2007).

La enzima responsable de la producción de levanos en *G. diazotrophicus* es la levansacarasa (LsdA), la cual es secretada al medio de cultivo (Hernández *et al.*, 1995). La LsdA es expresada constitutivamente por *G. diazotrophicus*, sin embargo muestra diferentes perfiles de actividad enzimática extracelular dependiendo de las condiciones nutricionales del medio en que se encuentra (Hernández *et al.*, 1995).

La enzima es constituida por una única cadena polipeptídica de 60,4 kDa y pI 5,5; su actividad polimerasa es máxima a 30-40 °C y pH 5,0-5,5. LsdA cataliza la transferencia del residuo fructosilo de la sacarosa a las moléculas aceptoras (agua, sacarosa, levano o glucosa), mediante un mecanismo cinético de doble desplazamiento que involucra la formación de un intermediario transitorio enzima-fructosilo.

Los valores de las constantes cinéticas de los pasos de la reacción, que conducen a la formación del complejo EF, son similares a los encontrados para las levansacarasas de *Bacillus subtilis* y *Streptococcus salivarius* (Hernández *et al.*, 1995). Estas enzimas, sin



embargo, muestran diferencias en cuanto a la especificidad por el sustrato aceptor del residuo fructosilo. LsdA muestra la particularidad de producir y acumular altos niveles de los FOS 1-kestosa y nistosa, compuestos de elevado interés comercial. La polimerización de la sacarosa *in vivo* resulta en la síntesis de largas cadenas de levanos, con masa molecular superior a  $2 \times 10^6$  Da. (Hernández *et al.*, 1995).

Estudios de RFLP revelaron que el gen *lsdA* constituye un locus cromosómico de copia única y escaso grado de polimorfismo entre poblaciones de *G. diazotrophicus* provenientes de diferentes hospederos y regiones geográficas distantes. La mutación de este gen, en cuatro genotipos representativos de la especie, provocó la inactivación total de la actividad levansacarasa y, en consecuencia, las bacterias mutadas perdieron la capacidad de utilizar la sacarosa como fuente de carbono (Hernández, 1999b).

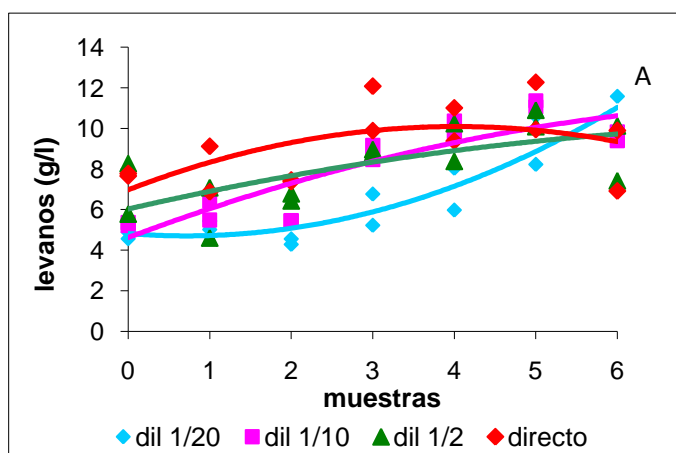
### 5.2.1. Estudios con diferentes sobrenadantes

Inicialmente se estudiaron dos medios de cultivos distintos para la obtención de sobrenadantes conteniendo la LsdA, los cuales se utilizaron como material para realizar las incubaciones. La diferencia entre los medios de cultivos evaluados fue principalmente la fuente de carbono y energía utilizada en los cultivos. También se estudiaron variaciones en las relaciones enzima/sustrato, mientras que la temperatura y el pH se mantuvieron constantes.

De los datos de actividad enzimática obtenidos con los diferentes sobrenadantes se observó una mayor síntesis de LsdA en el cultivo en el que se utilizó glicerol como fuente de carbono (3,374 UE/ml) que en el caso del cultivo con sacarosa (2,521 UE/ml). Las diferentes diluciones de los sobrenadante se llevaron a concentraciones finales, indicadas en materiales y métodos (Capítulo 2), con una solución de sacarosa de 100 g/l en buffer acético/acetato pH 5.2 la cual fué esterilizada por filtración. La incubación se llevo a cabo a temperatura constante en agitador rotatorio.

Evaluando la cantidad de levanos producidos en las incubaciones con 100 g/l de sacarosa como concentración de sustrato inicial, (figura 30) se observó que para los dos sobrenadantes la producción de levanos presenta en algunos casos un comportamiento de segundo grado, mientras que en otros la concentración de levanos aumenta con el tiempo de incubación durante todo el experimento. Se vio un aumento en la

concentración de los polisacáridos en el sistema durante las primeras 48 horas (muestra 3) para todas la muestras.

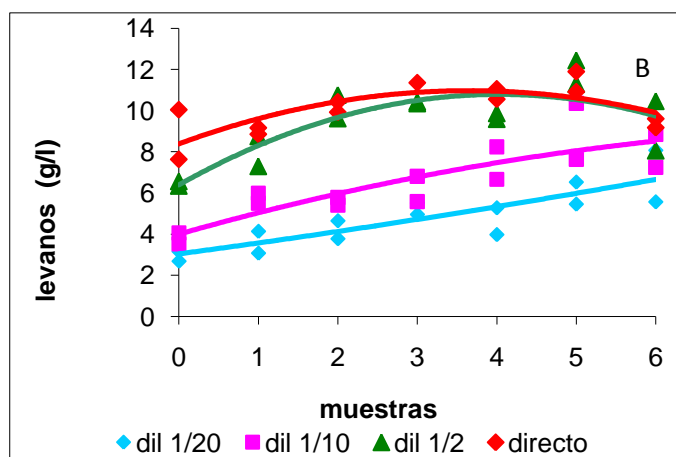


**Figura 30** Producción de levanos en sistema de incubación batch libre de células. Diferentes medios para la generación de los sobrenadantes a 30 °C.

A: LGI con 15 g/l de glicerol, y enriquecido con 1.5 g/l de extracto de levadura y 1.5 g/l triptona.

B: LGI con 20 g/l de sacarosa, y enriquecido con 1.5 g/l de extracto de levaduras y 1.5 g/l triptona. Esterilizado por filtración.

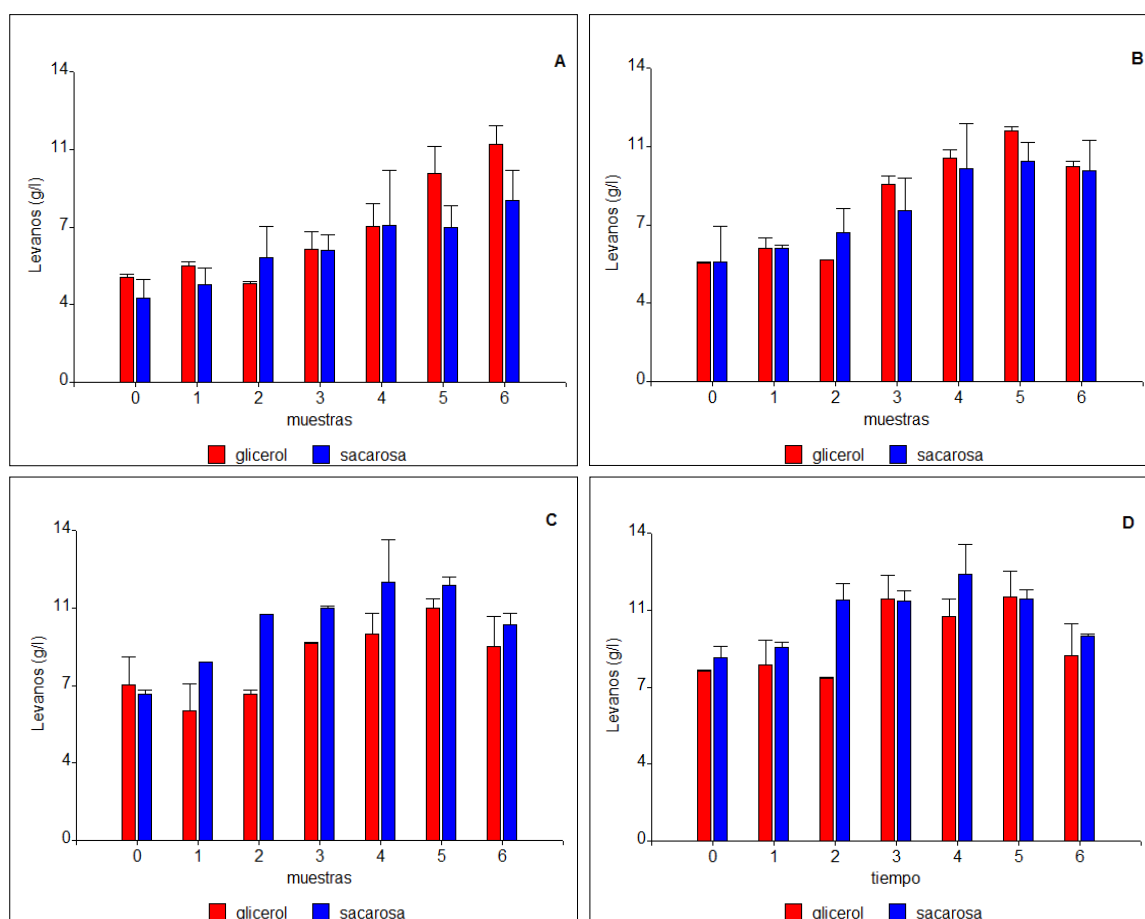
Muestras: 0 = 0 hs, 1 = 12 hs, 2 = 24 hs, 3 = 48 hs, 4 = 72 horas, 5 = 96 horas, 6 = 7 días



Luego de ese tiempo de incubación la concentración de levanos pareciera mantenerse constante ó, en algunas muestras, presentar una disminución. Pero no se pudo observar un comportamiento común en todas las muestras ensayadas por la dispersión de los datos obtenidos en estos experimentos. En este aspecto se pudo observar (figura 30) que los sobrenadantes provenientes de cultivos con glicerol generaron una dispersión mayor entre los replicados que los sobrenadantes generados en cultivos con sacarosa. Dicha dispersión no permitió, para dichos sobrenadantes, apreciar tampoco una diferencia significativa en la producción de levanos entre las diferentes diluciones ensayadas.

Según las cuantificaciones de glucosa liberada se observó que se generaron aproximadamente 50 g/l del monosacárido al final de las incubaciones, lo que indica que se hidrolizó toda la sacarosa utilizada como sustrato de las incubaciones (100 g/l de sacarosa) a lo largo de las mismas sin importar las diluciones y el origen del sobrenadante.

Teniendo en cuenta que la relación enzima/sustrato puede afectar a la generación de levanos, se estudiaron diferentes relaciones generando las mismas por diluciones de los sobrenadantes, pero manteniendo constante la concentración del sustrato (100 g/l de sacarosa). Se evaluaron de esta forma altas relaciones enzima/sustratos (diluciones 1/2 y sin dilución) y bajas (diluciones 1/20 y 1/10).



**Figura 31:** Producción de levanos (g/l) a lo largo del tiempo con dos sobrenadantes (rojo = glicerol; azul = sacarosa), a 30 °C y distintas diluciones del sobrenadante: A) dilución 1/20, B) dilución 1/10, C) dilución 1/2, D) sin dilución. Muestras: 0 = 0 hs, 1 = 12 hs, 2 = 24 hs, 3 = 48 hs, 4 = 72 horas, 5 = 96 horas, 6 = 7 días

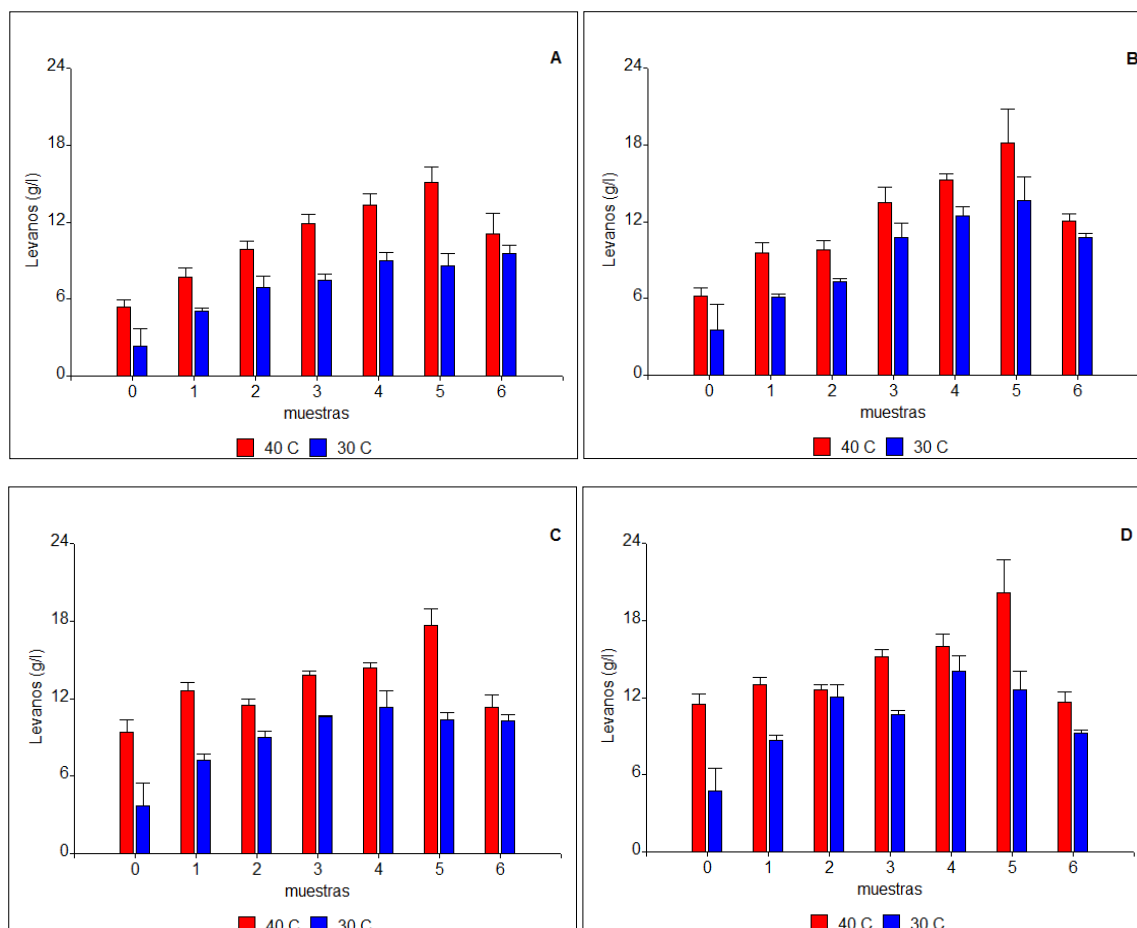
Realizando gráficos de barras comparativos de los levanos producidos en las incubaciones con sobrenadantes provenientes de glicerol y de sacarosa, para cada una de las diluciones (grafico 31); se observó que el sobrenadante que proviene del medio con sacarosa brindó mejores resultados, ya que presenta una menor dispersión entre replicados (grafico 30) y además superó el 10 % de rendimiento (conversión de sacarosa en levanos) en la mayoría de las diluciones evaluadas, siendo mayor al 13 % en los ensayos donde la relación enzima/sustrato es elevada (diluciones bajas).

### 5.2.2. Estudios con diferentes temperaturas.

Como detallan Döbereiner (1993) y Stephan (1991) la temperatura óptima de crecimiento de *G. diazotrophicus* es de 30 °C. Por su parte Hernández (1995) muestra que la temperatura óptima para la actividad de LsdA es de 40 °C. Para poder dilucidar el efecto que la temperatura puede significar en la producción de levanos se estudió el perfil de producción de estos polisacáridos bajo estas dos temperaturas de incubación utilizando sobrenadantes de *G. diazotrophicus* crecidos con sacarosa como fuente de carbono y energía.

Evaluando la producción de levanos bajo diferentes temperaturas de incubación (figura 32), los mayores rendimientos de producción fueron obtenidos en las incubaciones a 40 °C a las 96 hs de incubación (muestra 5), independientemente de la relación enzima sustrato empleada. Mientras que en las incubaciones a 30 °C se obtuvo una producción máxima de 15 g/l de levanos en la dilución 1/10 con el sobrenadante proveniente de sacarosa, a 40 °C se obtuvieron más de 20 g/l de levanos en los sobrenadantes sin dilución a las 96 horas de transcurrida la incubación. Por lo que, un aumento en la temperatura de incubación significó una mayor producción de levanos tal cual lo descrito por Hernández (1995). Además, una variación en la relación enzima/sustrato modificó el perfil de producción de levanos en este sistema de producción libre de células, siendo una relación alta de enzima/sustrato la que pareciera favorecer la producción de estos polisacáridos.

En la figura 32 se observa una disminución en la concentración del polisacárido a partir de las 96 horas de incubación (muestra 5). Menéndez *et al.* (2002) caracterizaron una exolevanasa (LsdB) de carácter extracelular en *G. diazotrophicus*. Esta enzima es responsable de la hidrólisis enzimática de levanos y la liberación de unidades de fructosa que pueden ser luego metabolizadas por esta bacteria. Según lo descrito por Menéndez (2009), LsdB presenta una expresión y actividad dependientes de la concentración de glucosa y sacarosa en el medio de cultivo. Debido a que el sistema de trabajo utilizado en estos experimentos no incluyó ningún paso de purificación enzimática de los sobrenadantes, es probable que la presencia de LsdB activa en el sistema de incubación sea la enzima responsable de la caída en la concentración de levanos obtenida a los 7 días de incubación.



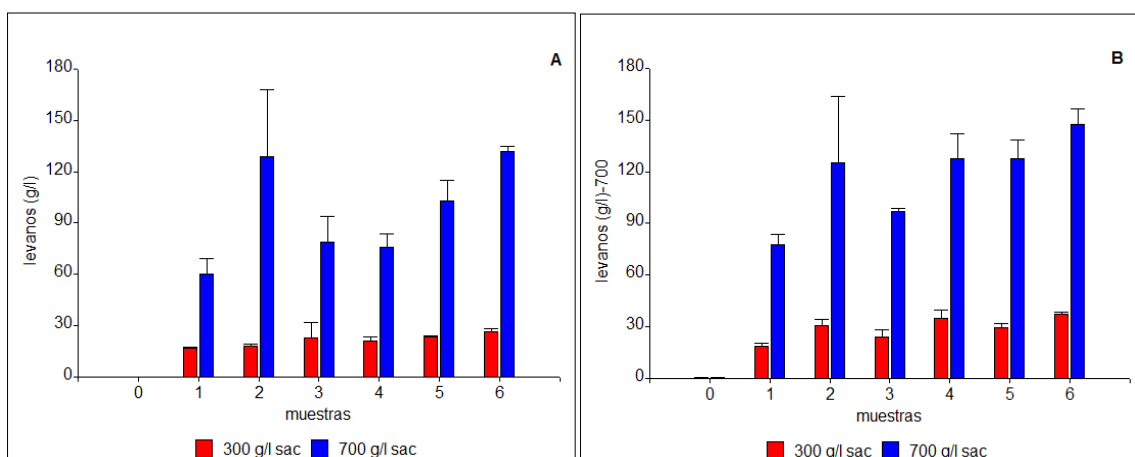
**Figura 32:** Producción de levanos (g/l) a lo largo del tiempo, bajo dos temperaturas ambientales (rojo = 40 °C; azul = 30 °C) y distintas diluciones del sobrenadante proveniente de un cultivo de *G. diazotrophicus* con sacarosa: A) dilución 1/20, B) dilución 1/10, C) dilución 1/2, D) sin dilución. Muestras: 0 = 0 hs, 1 = 12 hs, 2 = 24 hs, 3 = 48 hs, 4 = 72 horas, 5 = 96 horas, 6 = 7 días

### 5.2.3. Estudios con diferentes concentraciones de sacarosa

En la producción industrial de levanos, la concentración de sacarosa empleada varía entre 700 y 800 g/l. Altas concentraciones de sacarosa conllevan una muy elevada presión osmótica de las mezclas de incubación que impide el crecimiento de microorganismos contaminantes (Crittenden y Playne, 1996; Yun, 1996; Slavin, 1999; Sangeetha *et al.*, 2005).

Con el objeto de estudiar el perfil de producción de levanos frente a altas concentraciones de sacarosa hemos realizado incubaciones en sistema batch libres de células con concentraciones variables del disacárido, 300 y 700 g/l, frente a dos diluciones del sobrenadante que reflejan una relación enzima/sustrato baja (dilución

1/20) y una alta (sin dilución). Como se evaluó en el apartado anterior, la temperatura de incubación con mayor producción de levanos fue 40 °C, por lo que esta fue la temperatura ambiente utilizada en estas incubaciones. Mientras que el sobrenadante empleado fue proveniente de un cultivo batch de *G. diazotrophicus* con sacarosa (figura 33).



**Figura 33:** Producción de levanos con diferentes concentraciones de sacarosa (rojo = 300 g/l de sacarosa; azul = 700 g/l de sacarosa), a 40 °C y diferentes diluciones del sobrenadante proveniente de un cultivo de *G. diazotrophicus* con sacarosa: A) dilución 1/20, B) sin dilución. Muestras: 0 = 0 hs, 1 = 12 hs, 2 = 24 hs, 3 = 48 hs, 4 = 72 horas, 5 = 96 horas, 6 = 7 días

De la figura 33 se puede observar que una concentración de sacarosa de 700 g/l fue la condición con mayor producción de levanos en todas las muestras evaluadas, sin importar la relación enzima/sustrato. La dilución 1/20 del sobrenadante reflejó una producción disminuida de levanos sin importar el tiempo de incubación transcurrido. Para las incubaciones sin dilución se obtuvo una producción de levanos máxima luego de las 72 horas de incubación sin presentarse un descenso en la concentración de los mismos, al menos hasta los 7 días de incubación. En estas condiciones la producción de levanos máximas junto con sus rendimientos en porcentaje de sacarosa convertida en levanos se muestran en la tabla 12.

[Sacarosa]	Dilución	Levanos (g/l)	Rendimiento (%)
300 g/l	1/20	26,52 ± 4,19	8,84 ± 1,39
	directo	37,09 ± 3,05	12,36 ± 1,01
700 g/l	1/20	131,98 ± 5,88	18,85 ± 0,84
	directo	147,78 ± 17,16	21,11 ± 2,45

**Tabla 12:** Producción máxima de levanos (g/l) en sistema libre de células. Rendimiento en porcentaje de sacarosa convertida en levanos.

De esta forma se pudo establecer que para una producción de levanos en un sistema batch libre de células, la mejor condición es la generada por la utilización de las siguientes condiciones:

- sobrenadante proveniente del crecimiento de *G. diazotrophicus* en sacarosa,
- temperatura de incubación de 40 °C,
- relación enzima/sustrato alta,
- solución de sacarosa de 700 g/l
- tiempo de incubación de 72 h (muestra 4).

Teniendo en cuenta que la extracción de inulina (fructano de alto peso molecular extraído de plantas con características fisicoquímicas semejantes al levano) a partir de plantas de alcaucil de Jerusalén sólo provee de un rendimiento cercano al 15 % (Lingyun *et al.*, 2007; Saengthongpinit y Sajjaanantakul, 2005), y la producción industrial de levanos con el uso de *Zymomonas mobilis* llega al 20 % (Sangeetha *et al.*, 2005), el rendimiento máximo de producción de levanos en este sistema, que alcanzó el 21 % de conversión de la sacarosa inicial en polisacárido, representa un buen punto de partida para el desarrollo de una estrategia de producción en masa de levanos.

### 5.3. Producción de FOS en sistemas libres de células.

Los FOS son un tipo de fructanos constituidos por unidades de fructosa unidas por enlaces  $\beta$  (2-6) que no superan las 10 unidades formando un polímero lineal. Los FOS constituyen una serie de oligosacáridos homólogos derivados de la sacarosa usualmente representado por la fórmula  $GF_n$ . Los dos FOS más representativos son 1-kestosa y nistosa (Yun, 1996).

Estos azúcares producen cristales finos rápidamente. Comparando soluciones al 10% de 1-kestosa, nistosa y 1<sup>F</sup>-fructofuranosil nistosa con una solución de sacarosa de igual concentración, los oligosacáridos mantienen el 31, 22 y 16% del poder edulcorante de la sacarosa, respectivamente. Los FOS son altamente higroscópicos, lo cual dificulta el almacenamiento de productos liofilizados en condiciones atmosféricas por tiempos prolongados. La viscosidad de una solución de FOS es relativamente más alta que la de la sacarosa a la misma concentración y posee una mayor estabilidad térmica. (Neosugar User's guide, Meiji Seika Co., Kawasaki-Shi, Japan, 1982). También los FOS son altamente estables en un rango de pH desde 4,0 hasta 7,0; valores normales en alimentos.

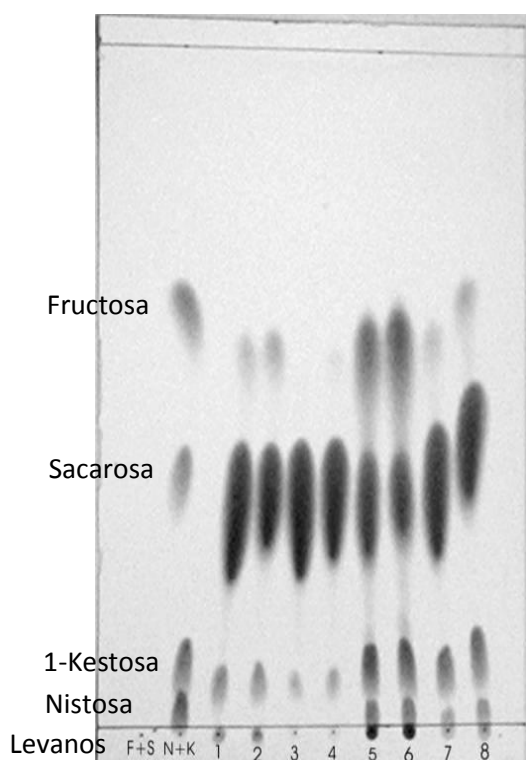
En respuesta a un incremento en la demanda del consumo de alimentos de bajas calorías desde los años `80 se está estudiando la capacidad edulcorante de compuestos alternativos como los FOS, los cuales poseen grados edulcorantes semejantes o inferiores a la sacarosa. Todos estos compuestos son nuevos productos introducidos al mercado donde los FOS presentan una mayor atracción que es atribuida principalmente a que su producción a gran escala no es complicada y a que el gusto dulce es muy similar de la sacarosa (Yun, 1996).

La búsqueda de la producción en masa de levanos no está exenta de la obtención de una mezcla de levanos, FOS, sacarosa, fructosa y glucosa en la solución resultante (Crittenden y Playne, 1996; Yun, 1996; Slavin, 1999; Sangeetha *et al.*, 2005). En este sentido evaluamos la existencia de FOS y el perfil de consumo de sacarosa en los sistemas libres de células estudiados en los apartados anteriores (figura 34).

En todos los casos se observó la producción de FOS de bajo peso molecular con predominancia de kestosa. En los casos donde la concentración de sacarosa fue de 100 g/l, este disacárido fue consumido totalmente en los tiempos de incubación ensayados,



mientras que en los casos de 300 y 700 g/l de sacarosa, la sacarosa no se consumió totalmente (figura 34).



**Figura 34:** TLC de incubaciones a 40 °C. F+S: patrón de fructosa y sacarosa; N+K: patrón de 1-nistosa y 1-kestosa; 1-4 muestra con 300 g/l de sacarosa: 1) dilución 3/4 12 horas de incubación; 2) dilución 3/4, 7 días de incubación; 3) dilución 1/20, 12 horas de incubación; 4) dilución 1/20, 7 días de incubación; 5-8 muestra con 700 g/l de sacarosa 5) dilución 3/4 12 horas de incubación; 6) dilución 3/4, 7 días de incubación; 7) dilución 1/20, 12 horas de incubación; 8) dilución 1/20, 7 días de incubación.

La generación de fructosa libre en altas concentraciones no se modificó por cambios en ninguno de los parámetros estudiados. En la figura 34 se observa que bajas relaciones enzima/sustrato favorecen la producción de FOS mientras que altas relaciones favorecen la producción de levanos, con lo cual la relación enzima/sustrato tuvo efectos sobre la síntesis de polisacáridos de diferentes grados de polimerización. La condición en la que se favoreció la producción de FOS fue dada por los siguientes parámetros:

- sobrenadante proveniente del crecimiento de *G. diazotrophicus* en sacarosa,
- temperatura de incubación de 40 °C,
- relación enzima/sustrato baja,
- solución de sacarosa de 700 g/l
- tiempo de incubación de 12 hs.

Bajo estas condiciones se pudo cuantificar (sólo en algunas de las muestras obtenidas) una producción de FOS superior a los 20 g/l de los oligosacáridos presentando un rendimiento del orden del 3 % cuando se utilizaron 700 g/l de sacarosa. Comparando estos valores con lo publicado en bibliografía donde se llegan a rendimientos cercanos

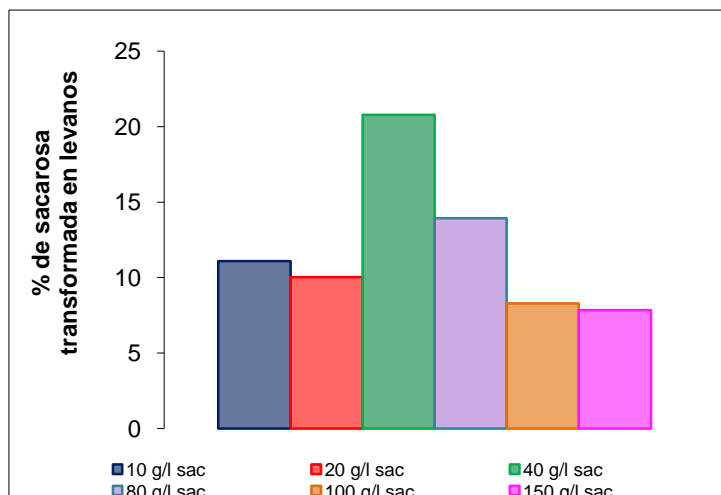
al 24 % para *Zymomonas mobilis* (Sangeetha *et al.*, 2005) o mayores al 55 % para enzimas inmovilizadas de hongos como *Penicillium citrinum* (Hayashi *et al.*, 1989) y *Aspergillus niger* (Yun, 1996), se concluye que esta estrategia no es, al menos en el grado de desarrollo actual de estos estudios, recomendable para una producción en masa de FOS. Sin embargo, en todas las condiciones evaluadas se produjo una mezcla de fructanos (FOS y levanos), sacarosa y glucosa que aparece como interesante de ser ensayada como aditivo en alimentación animal.

## 5.4. Producción de levanos en cultivos batch.

Un problema central en la producción de fructanos es que la actividad de las enzimas utilizadas es fuertemente inhibida por la glucosa generada como subproducto de la hidrólisis de la sacarosa. Como resultado de esto, muchos productos comerciales contienen una mezcla con altas concentraciones de sacarosa y glucosa (Yun, 1996). Así, la búsqueda de una estrategia para el consumo de este monosacárido es interesante para la producción en masa de los fructanos libres de otros azúcares. Recordando que *G. diazotrophicus* es capaz de crecer a expensas de sacarosa, produciendo fructanos extracelulares por acción de una levansacarasa (LsdA), que a su vez libera glucosa al medio de cultivo, monosacárido que es metabolizado por esta bacteria para su propio crecimiento; estudiamos la producción de fructanos en cultivo batch con diferentes estatus nutricionales y condiciones ambientales.

### 5.4.1. Diferentes concentraciones iniciales de sacarosa.

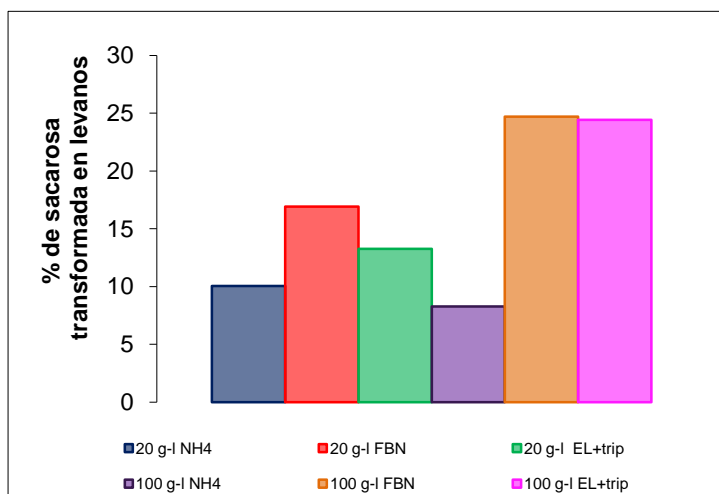
Evaluando la producción de levanos, precipitados con etanol como se indica en Materiales y Métodos, en los diferentes cultivos batch que se estudiaron en el Capítulo 3 se observó producción de este polisacárido en todas las condiciones nutricionales en las que se ha crecido *G. diazotrophicus*. En la figura 35 se muestran los porcentajes máximos de sacarosa convertida en levanos para cultivos con diferentes concentraciones iniciales de sacarosa con 3 g/l de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y pH constante a 6,00. Del análisis de este gráfico se observa que la producción de levanos superó en todas las condiciones estudiadas el 8% de conversión de la sacarosa inicial del cultivo. Teniendo en cuenta el perfil de crecimiento de *G. diazotrophicus*, el valor máximo de producción de levanos se obtuvo en la fase de crecimiento exponencial tardío. El mayor porcentaje de sacarosa convertido en levanos fue en los cultivos batch con control de pH con 40 g/l de sacarosa como fuente de carbono y energía, llegando a una conversión de la sacarosa cercana al 25%. Este porcentaje de conversión se obtuvo luego de 70 horas de iniciado el cultivo.



**Figura 35:** Porcentaje máximo de sacarosa convertido en levanos para cultivos batch con 3 g/l de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  con control de pH.

#### 5.4.2. Diferentes fuentes de nitrógeno.

Debido a las diferencias en los perfiles de crecimiento observados en los cultivos batch de *G. diazotrophicus* en condiciones de FBN y en exceso de fuente de nitrógeno que se mostraron el Capítulo 3, se evaluó la producción de levanos en condiciones de baja y alta concentración inicial de fuente de carbono y energía, 20 y 100 g/l de sacarosa respectivamente. En estos cultivos se modificaron las fuentes de nitrógeno generando tres condiciones diferentes con respecto a este nutriente: 1) NoFBN (3g/l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ); 2) FBN y 3) E.L. y trip (1,5 g/l extracto de levaduras + 1,5 g/l triptona) (figura 36).



**Figura 36:** Porcentaje máximo de sacarosa convertido en levanos para cultivos batch con 20 y 100 g/l de sacarosa y diferentes fuentes de nitrógeno, con control de pH.

La producción de levanos en los cultivos con 20 g/l de sacarosa en FBN se vio significativamente aumentada con respecto al mismo cultivo en NoFBN. En la condición de FBN se obtuvo un máximo de 3,4 g/l de levanos producidos representando

más del 15% de conversión de la sacarosa, mientras que en la condición NoFBN se produjo sólo 1,95 g/l representado menos del 10% de conversión de la sacarosa inicial (figura 36). En los cultivos enriquecidos en fuente de nitrógeno (E.L+trip.) se observó un 13% de conversión de la sacarosa inicial.

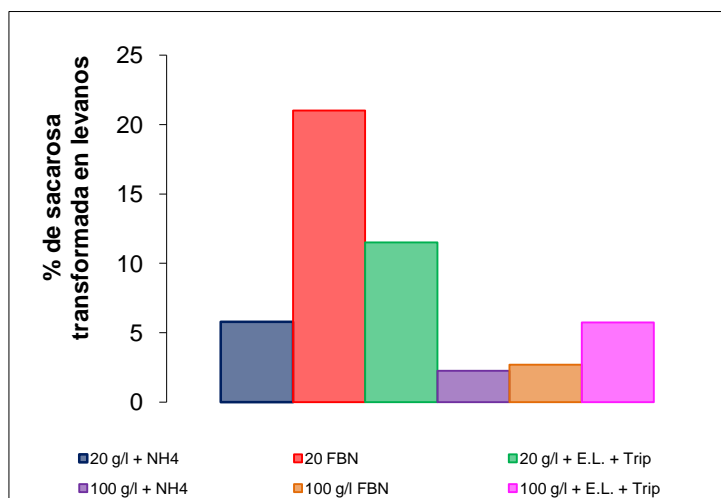
La posibilidad de los levanos de ser utilizados como una barrera física frente a la protección de la nitrogenasa por la inhibición por O<sub>2</sub>, propuesta en la literatura para otros diazotrofos (Hill, 1971; Rippka *et al.*, 1979) y ya observada en los cultivos continuos del Capítulo 4, debe ser tenida en cuenta. Un aumento en la producción de levanos podría ser una estrategia microbiana para limitar la difusión de O<sub>2</sub> ayudando a la FBN impidiendo la inhibición de la nitrogenasa por acción del O<sub>2</sub> ambiental. Con lo cual un ambiente que favorezca la FBN implicaría un aumento en la producción de levanos. Esto ocurrió en el caso de altas concentraciones de sacarosa ya que se obtuvo una diferencia significativa de producción de levanos en los cultivos bajo FBN si los comparamos con los cultivos en NoFBN.

Mientras tanto, los cultivos enriquecidos con E.L y triptona y altas concentraciones de sacarosa, presentaron una producción de levanos comparables a la obtenida en FBN. Este resultado muestra la dependencia de la síntesis de levanos con la naturaleza de la fuente nitrogenada. Probablemente las fuentes de nitrógeno orgánicas suministren esqueletos carbonados que el organismo utilice para la síntesis de biomasa y, en ese caso, quedaría más sacarosa en exceso para la producción de levanos.

### 5.4.3. Cultivos sin control de pH.

En cultivos batch de *G. diazotrophicus* la producción de ácidos orgánicos genera un descenso abrupto del pH del cultivo. Attwood *et al.* (1991) mostraron que este endófito crece a pH 3,5 en condiciones de cultivos continuos presentando un alto requerimiento energético que es reflejado en un mecanismo de homeostasis citoplasmático dependiente de energía. Frente a las observaciones del apartado anterior, donde se mostró el efecto de condiciones de FBN sobre la producción de levanos, y considerando a esta condición como una situación de estrés para el microorganismo, el estudio de la producción de levanos frente a un estrés abiótico nos resulto de interés. Así es como se llevaron a cabo cultivos batch de *G. diazotrophicus* en condiciones de baja y alta

concentración de sacarosa, diferentes estatus nutricionales con respecto a la fuente de nitrógeno y sin control de pH (figura 37).



**Figura 37:** Porcentaje máximo de sacarosa convertido en levanos para cultivos batch con 20 y 100 g/l de sacarosa y diferentes fuentes de nitrógeno, sin control de pH.

Los levanos son estables a pH superiores a 4,00. A los valores de pH detectados en los cultivos, los levanos son hidrolizados liberándose los residuos de fructosa constituyentes (Sangeetha *et al.* 2005). Por lo tanto, el principal efecto del pH en la producción de levanos estaría vinculado a la hidrólisis ácida del polisacárido. En condiciones de exceso de sacarosa, los valores de pH descendieron por debajo de 2,00, principalmente por la producción de ácidos orgánicos ya discutida en apartados anteriores. Es por eso que no se observaron producciones significativas en cultivos con altas concentraciones de sacarosa. Sin embargo en el caso de los cultivos con concentraciones bajas de sacarosa se obtuvieron porcentajes de conversión cercanos al 21% para la FBN, condición en la cual el pH llegó a valores cercanos a 3,00. Comparando los niveles de levanos producidos en condiciones de acidez con los niveles de levanos producidos en los batch con control de pH (figura 36) observamos que en los cultivos con baja concentración de sacarosa y NH<sub>4</sub><sup>+</sup> la variación de pH significó una disminución de la producción de levanos a la mitad. Sin embargo en los cultivos en FBN y enriquecidos con E.L y triptona, los rendimientos son semejantes. Recordando los resultados de rendimiento en biomasa mostrados en el Capítulo 3 para los cultivos sin control de pH vimos que los cultivos con NH<sub>4</sub><sup>+</sup> también presentaron un rendimiento celular muy disminuido. Es claro que para los cultivos limitados en carbono y NH<sub>4</sub><sup>+</sup> el descenso de pH significó un aumento en el consumo de la sacarosa hacia la producción de energía y por ende, una disminución en la producción de levanos.

Por su parte los cultivos con 100 g/l de sacarosa mostraron una producción de levanos significativamente inferior a la obtenida con control de pH (figuras 36 y 37). La producción de ácido glucónico en estos cultivos se vio altamente estimulada (Capítulo 3) por lo cual el descenso de pH en estos cultivos llegó a valores inferiores a 2,00. Como se mencionó anteriormente, a esos valores de pH se produce la hidrólisis ácida de estos polisacáridos derivando en la liberación de fructosa y glucosa al medio. Es por esta razón que la producción de levanos en los cultivos con 100 g/l de sacarosa y sin control de pH se vio significativamente disminuida con respecto a los cultivos batch con las mismas condiciones nutricionales pero controlando el pH a 6.0.

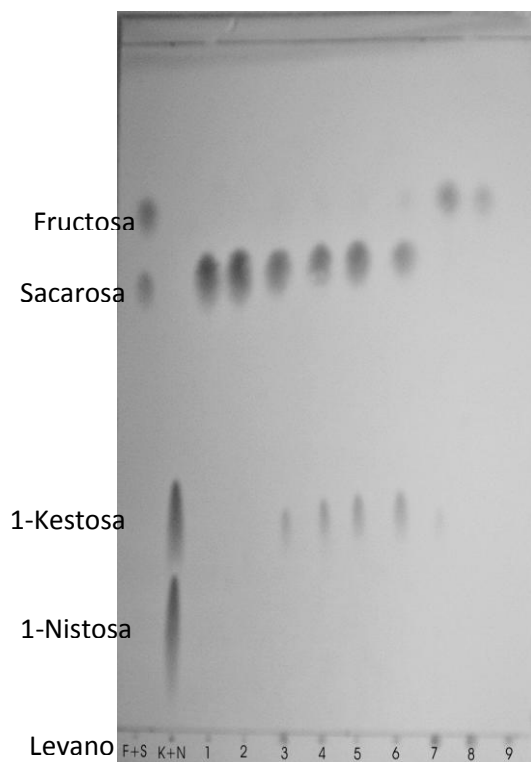
Concluyendo, se observó que el máximo porcentaje de sacarosa derivado hacia la formación de levanos, para los cultivos batch limitados en carbono y sin control de pH (figura 37), fue semejante al obtenido en cultivos batch con 40 g/l de sacarosa, NoFBN y pH controlado (figura 35). Los mayores rendimientos en levanos fueron obtenidos en los cultivos batch con 100 g/l de sacarosa en FBN y enriquecidos con extracto de levaduras y triptona a pH constante.

## 5.5. Producción de FOS en cultivos batch.

Existen referencias que indican que algunas bacterias producen levansacarosas, pero las enzimas productoras de FOS son muy raras en condiciones de estrés bacteriano. Enzimas que producen FOS a partir de la sacarosa fueron aislada de *Bacillus macerans* (Park *et al.*, 2001). Por su parte, la bacteria productora de etanol *Zymomonas mobilis*, produce, vía una levansacarasa, FOS y levanos. Las levansacarosas extracelulares como la de *Zymomonas mobilis*, que precipitan con los levanos frente al tratamiento con etanol, han sido utilizadas para la producción de FOS en cultivos con sacarosa (Beker *et al.*, 2002).

En esta dirección se estudió de presencia de FOS en los sobrenadantes de los diferentes cultivos batch realizados con *G. diazotrophicus*.

Utilizando la técnica de cromatografía en capa delgada visualizamos que, en el transcurso de los cultivos, la aparición de FOS (predominante de 1-Kestosa (figura 38)) se observó a partir del inicio del crecimiento exponencial. Se obtuvo un aumento de la concentración de estos oligosacáridos en el transcurso del cultivo, en todas las condiciones estudiadas, sin importar la concentración de sacarosa inicial ó la fuente de nitrógeno.



**Figura 38:** TLC de cultivo batch con 20 g/l de sacarosa y 3 g/l de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  con control de pH. F+S: patrón de fructosa y sacarosa; N+K: patrón de 1-nistosa y 1-kestosa; 1-9 muestras de diferentes tiempos del cultivo.



Yun (1996) plantea la posibilidad de que la 1-kestosa sea utilizada como fuente de residuos fructosilos para continuar con la polimerización de fructanos de mayor peso molecular. Luego de la muestra 7 (figura 38), cuando el cultivo entraba en una fase de desaceleración del crecimiento microbiano, se observó desaparición de la 1-kestosa y, paralelamente, un incremento en la concentración de levanos.

Menéndez *et al.* (2004) demostró la existencia de una exolevanasa extracelular en *G. diazotrophicus*. La 1-kestosa producida en los primeros momentos del cultivo pudo también ser utilizada como material hidrolizable enzimáticamente como suministro de fructosa libre destinada a fuente de carbono y energía. Este comportamiento coincide con un agotamiento de la glucosa disponible y la finalización del crecimiento exponencial microbiano como describieron Menéndez *et al.* (2009). Al respecto, en la muestra 9 de la TLC (figura 38) se vio un descenso en la concentración de levanos con respecto a la muestra anterior, con lo cual se puede especular que, aunque sea parcialmente, los levanos pudieron ser utilizados como fuente de fructosa para su utilización como fuente de carbono y energía.

En las primeras horas de los cultivos en FBN se favoreció la hidrólisis de la sacarosa frente a la polimerización de los residuos fructosilos, generando mayoritariamente fructosa libre en lugar de FOS. Asimismo, en los cultivos enriquecidos con fuentes de nitrógeno orgánicas, se favoreció la producción de levanos frente a la producción de FOS. La producción de FOS se vio favorecida en los cultivos con  $\text{NH}_4^+$  (datos no mostrados). Con lo cual, la producción de FOS se manifestó en todas las condiciones de cultivo estudiadas, siendo los cultivos en presencia de  $\text{NH}_4^+$  las que presentaron condiciones ambientales más favorables para su síntesis.

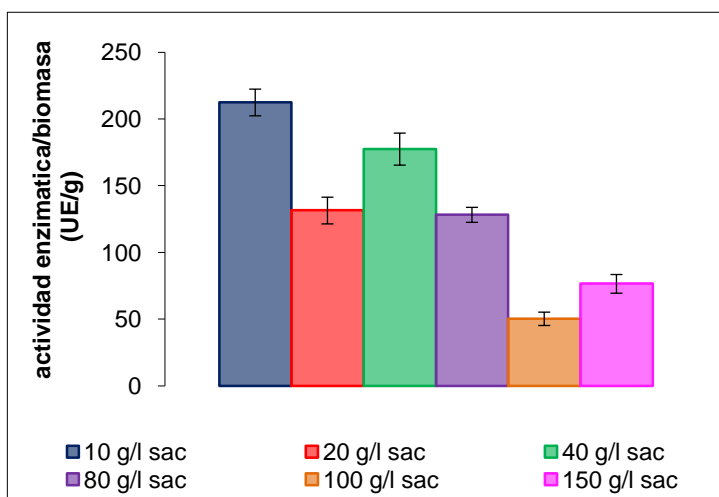
## 5.6. Síntesis de LsdA en cultivos batch.

Todas las levansacarosas conocidas son proteínas extracelulares, aunque existen diferentes rutas de secreción. La secreción de las levansacarasa en bacterias Gram (+) involucra el clivaje de un péptido señal del precursor de la proteína. Ejemplos de este sistema son las levansacarosas de *Bacillus subtilis* (Steinmetz *et al.*, 1985), *Bacillus amyloliquefaciens* (Tang *et al.*, 1990), *Geobacillus stearothermophilus* (Li *et al.*, 1997), *Paenibacillus polymyxa* (Bezzate *et al.*, 2000), *Streptococcus salivarius* (Rathsam *et al.*, 1993), entre otras (Bergeron *et al.*, 2000; Saito *et al.*, 1997; van Hijum *et al.*, 2004). Sin embargo, con la excepción de LsdA, otras levansacarosas caracterizadas hasta el momento en bacterias Gram (-) son secretadas por una vía independiente del péptido señal. Esto ocurre en *Zymomonas mobilis* (Song *et al.*, 1993), *Erwinia amylovora* (Geier y Geider, 1993), *Bahnella aquatilis* (Song *et al.*, 1998), *Pseudomonas syringae* (Hettwer *et al.*, 1998; Li y Ullrich, 2001) y *Gluconacetobacter xylinus* (Tajima *et al.*, 2000). En *G. diazotrophicus*, LsdA es sintetizada como una proteína precursora de 584 aminoácidos con un péptido señal N-terminal de 30 residuos que es hidrolizado en el espacio periplasmático durante la secreción. Este proceso proteolítico es seguido de la formación de un ciclo en el residuo Gln31, provocando el bloqueo total del extremo N de la proteína madura y proporcionándole su conformación final. Por lo cual este es un paso relativamente limitante en la maduración de LsdA. Una vez concluido este paso, la enzima madura es transferida a través de la membrana externa y se libera al espacio extracelular por medio de un sistema de secreción tipo II (Arrieta *et al.*, 2004). Este sistema de secreción en *G. diazotrophicus* esta genéticamente controlado por un operón de transcripción constitutiva, lo cual es lógico ya que el sustrato de este sistema es una enzima (LsdA) también de expresión constitutiva (Hernández *et al.* 1995).

En virtud de las diferencias en el perfil de crecimiento de *G. diazotrophicus* en condiciones de FBN frente a condiciones de disponibilidad de nitrógeno inorgánico (NoFBN), y de publicaciones realizadas referidas a un cambio en el perfil proteico de *G. diazotrophicus* en FBN (Luna *et al.*, 2002; 2006; 2009; Flores-Encarnación *et al.*, 1999; González *et al.*, 2006), surgió el interés de evaluar cómo se modifica la producción de LsdA en respuesta a diferencias nutricionales. Para cumplir con este objetivo se midió la actividad LsdA en los sobrenadantes de los cultivos batch estudiados en el Capítulo 3 de este trabajo.

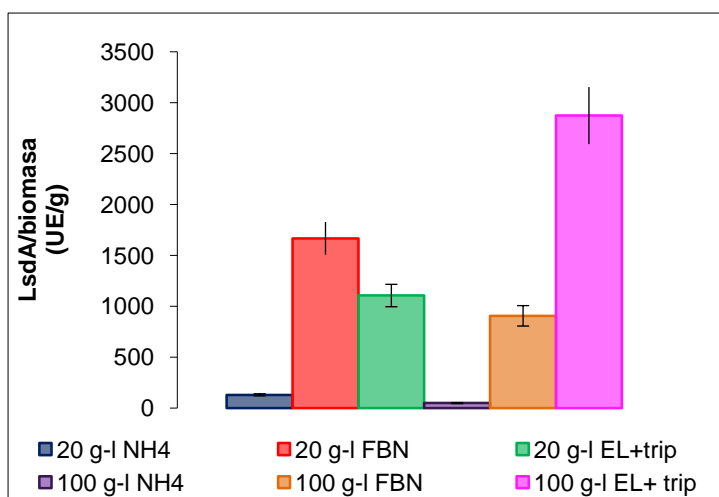
La máxima actividad LsdA obtenida en los sobrenadantes de los cultivos, batch con diferentes concentraciones de fuente de carbono y condiciones de NoFBN, fue en aquellos cultivos con una concentración inicial de sacarosa de 80 g/l. En efecto, cuando la concentración de sacarosa ascendió a 100 y 150 g/l se obtuvieron actividades enzimáticas menores y una mayor dispersión entre duplicados.

Siendo la LsdA responsable directa de la hidrólisis de la sacarosa, que genera biodisponibilidad de glucosa para ser metabolizada por *G. diazotrophicus* (Álvarez y Martínez-Dretz, 1995; Hernández *et al.*, 1995), es esperable que a mayor concentración de sacarosa disponible en el medio de cultivo la actividad de esta enzima se vea estimulada. También bajo condiciones de alta disponibilidad de fuente de carbono y energía es esperable obtener altos rendimientos en biomasa y, por ende, mayor producción de enzima. Sin embargo, como se vio en el Capítulo 3, los rendimientos celulares no aumentaron con el aumento de la concentración de sacarosa al superar los 40 g/l del azúcar, y tampoco se obtuvo un aumento en la actividad enzimática LsdA en el sobrenadante de los cultivos con concentraciones mayores a 80 g/l de sacarosa. Por tanto se consideró de utilidad evaluar las actividades enzimáticas específicas, entendiendo a estas como la cantidad de enzima obtenida por gramo de células producidas en el medio de cultivo (figura 38). Observamos que la mayor actividad LsdA por gramo de biomasa fue obtenida en los cultivos en condiciones limitantes de fuente de carbono y energía, 10 y 20 g/l de sacarosa. Por tanto son las condiciones de limitación de sacarosa las que favorecen la expresión de la LsdA. Este comportamiento, también observado por Luna (2003) para GDH-PQQ. La síntesis de esta enzima está regulada por la necesidad de una eficiente utilización de la fuente de Carbono y energía en situaciones donde la demanda energética es alta, como es el caso de la FBN, ó bien donde la fuente de carbono es escasa. Bajo condiciones de FBN y limitación por Carbono se observaron los mayores valores de actividad. Este patrón de síntesis es característico de enzimas que están involucradas en la captura (“scavenging”) del sustrato limitante del crecimiento en ambientes donde el mismo es escaso, ó bien deben competir con otros organismos para su incorporación.



**Figura 39:** Actividad enzimática específica (UE/g de biomasa) en sobrenadantes de cultivos con 3 g/l de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y diferentes concentraciones de sacarosa, con control de pH.

Calculando las actividades específicas de LsdA en diferentes condiciones de fuente de nitrógeno (FBN, NoFBN, enriquecidos con extracto de levaduras y triptona), en condiciones de limitación y no limitación en la fuente de carbono y energía, 20 g/l y 100 g/l de sacarosa respectivamente; se obtuvo la figura 40. En esta figura se observa que, tanto en los cultivos en FBN como en los enriquecidos con extracto de levaduras y triptona, se obtuvo un aumento en la síntesis de LsdA, sin importar la limitación de la fuente de carbono.



**Grafico 40:** Actividad enzimática específica (UE/g de biomasa) en sobrenadantes de cultivos con 20 g/l y 100 g/l de sacarosa y diferentes calidades de fuente de nitrógeno, con control de pH.

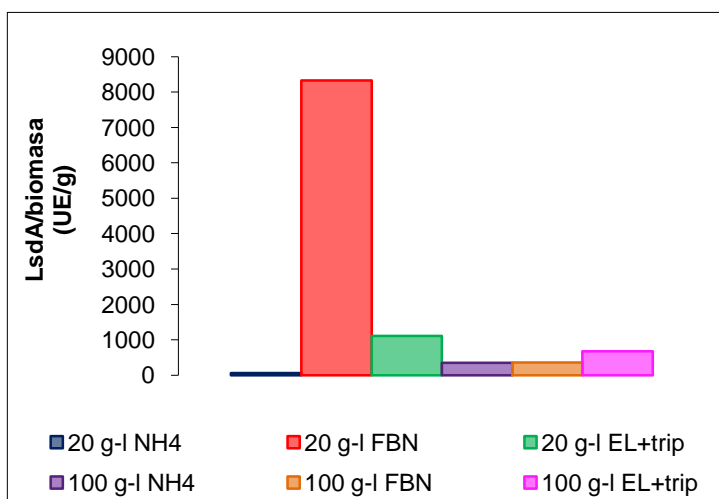
En los cultivos limitados en sacarosa la mayor actividad enzimática específica se obtuvo bajo condiciones de FBN. Mientras que en los cultivos con 100 g/l de sacarosa la síntesis de LsdA fue mayor en condiciones de enriquecimiento de nitrógeno llegando a un valor aproximado de 3000 UE/g de biomasa. Así las diferentes fuentes de nitrógeno evaluadas condujeron a perfiles de actividad específica de LsdA diferentes, influyendo también en estos perfiles la concentración de sacarosa en el medio de cultivo. Bajo

limitación por carbono la condición de FBN favoreció la síntesis de LsdA, mientras que en exceso de sacarosa la presencia de una fuente de nitrógeno compleja condujo a un estímulo en la síntesis enzimática.

La ausencia de control de pH puede ocasionar un estrés abiótico para *G. diazotrophicus*. Sin embargo este microorganismo está caracterizado como ácido-tolerante, mostrando la capacidad de crecimiento y fijación de N<sub>2</sub> a valores de pH entre 2,5 y 7,0 (Stephan et al. 1991, Burris 1994). En el año 2008 Luna *et al.* reportaron el crecimiento de *G. diazotrophicus* a valores de pH extremos (2,5-7,5) y como se modifica el metabolismo de la glucosa en condiciones de FBN.

Con el objeto de determinar si la falta de control de pH modificaba la actividad LsdA de *G. diazotrophicus*, en cultivos con sacarosa como fuente de carbono y energía sin control de pH se determinó la actividad enzimática específica de *G. diazotrophicus* creciendo con 20 y 100 g/l de sacarosa, diferentes fuentes de nitrógeno y sin control de pH (figura 41). En estas condiciones el pH del medio, luego de 12 horas post-inoculación había disminuido a valores del orden de 2,00.

En condiciones de acidez *G. diazotrophicus* fue capaz de presentar actividad LsdA, siendo los cultivos con 20 g/l de sacarosa y FBN los que presentaron la mayor síntesis de LsdA (figura 41) donde el valor superó las 8000 UE/g de biomasa.



**Figura 41:** Actividad enzimática específica (UE/g de biomasa) en sobrenadantes de cultivos con 20 g/l y 100 g/l de sacarosa y diferentes calidades de fuente de nitrógeno, sin control de pH.

Por tanto, cultivos limitados en carbono, fijando nitrógeno atmosférico y sin control de pH, parecen ser la fuente de elección para la producción de sobrenadantes de cultivos para ser usados como extractos crudos de LsdA en incubaciones libres de células.

# Capítulo 6:

**Conclusiones.**



## 6.1. Conclusiones generales.

Debido al desconocimiento de la regulación metabólica de la síntesis de polisacáridos extracelulares por *G. diazotrophicus* creciendo en presencia de sacarosa como fuente de carbono y energía, se propuso como uno de los objetivos de este trabajo generar información sobre el comportamiento metabólico de este microorganismo ante diferentes situaciones nutricionales utilizando este disacárido como única fuente de carbono variando su concentración inicial desde condiciones de limitación hasta condiciones de exceso. Paralelamente se ensayaron distintas alternativas en el tipo de fuente de nitrógeno utilizada dada la importancia de este nutriente en el contexto nutricional de los microorganismos. Para ello, además del uso de fuentes de nitrógeno fijado, tanto inorgánicas como orgánicas, se utilizó la capacidad de *G. diazotrophicus* de fijar nitrógeno biológicamente en vida libre. En vista de los resultados obtenidos, detallados en los capítulos precedentes, se pudo demostrar que *G. diazotrophicus* es capaz de crecer y fijar nitrógeno tanto en cultivos continuos como en cultivos batch utilizando sacarosa como principal fuente de carbono y energía. También produjo FOS y levanos en todas las condiciones estudiadas presentando actividad LsdA extracelular en forma de varias isoenzimas que difieren en su pI, siendo esta enzima la principal responsable de la producción de los fructanos obtenidos. También se pudo determinar que en condiciones de limitación de fuente de carbono y utilizando como fuente de nitrógeno una mezcla de componentes inorgánicos y orgánicos (amonio y extracto de levaduras) se obtienen los mayores rendimientos en la producción de biomasa. Se encontró que el pH, un estrés abiótico para microorganismos heterótrofos, influye muy marcadamente en la producción de biomasa en cultivos de *G. diazotrophicus*. Este microorganismo fue capaz de sintetizar ácido glucónico en cultivos batch, observándose producción de ceto-ácidos sólo en cultivos en exceso de sacarosa y enriquecidos con fuentes de nitrógeno orgánico (extracto de levaduras y triptona). La máxima producción de ácido glucónico se obtuvo durante la fase de crecimiento exponencial medio a tardío, generando un marcado descenso en el pH del medio. Sin embargo esta producción de ácido glucónico fue muy inferior a la descrita cuando este microorganismo crece utilizando glucosa.

Los cultivos batch son un acercamiento a la caracterización fisiológica de *G. diazotrophicus*, sin embargo una idea más acabada de los procesos metabólicos capaces

de ser desarrollados por un microorganismo puede obtenerse mediante la realización de cultivos continuos. Así se llevaron a cabo este tipo de cultivos limitados y no limitados en sacarosa y, a su vez, bajo condiciones de fijación biológica de nitrógeno (FBN) ó con el agregado de sales de amonio (NoFBN). Con el cálculo de parámetros estequiométricos del crecimiento microbiano, a partir de mediciones realizadas sobre estos cultivos continuos, pudimos evaluar que en condiciones de FBN se ve un aumento significativo de los flujos metabólicos que conducen hacia la fosforilación oxidativa y a la producción de levanos que, puede especularse, son utilizados como una barrera física para limitar la difusión del O<sub>2</sub>. Estas adaptaciones metabólicas (aumento de la tasa respiratoria y producción de exopolisacáridos) son expresadas por diversos microorganismos como herramienta para la protección de la nitrogenasa frente a su inhibición por O<sub>2</sub>, generando un fenotipo microbiano eficiente para la FBN.

La literatura muestra que *G. diazotrophicus*, crecido en cultivos continuos con glucosa como principal fuente de carbono y energía, produce ácido glucónico y ceto-ácidos sin importar la concentración inicial del azúcar en el medio de cultivo. Sin embargo, cuando se utiliza la sacarosa como fuente de carbono y energía, hemos visto que este microorganismo fue incapaz de producir ácido glucónico durante su crecimiento en cultivos continuos limitados en sacarosa. Este fenotipo concuerda con la ausencia de actividad de las enzimas responsables de la producción de estos ácidos orgánicos (GDH-PQQ y GaDH). Bajo estas mismas condiciones nutricionales, y teniendo en cuenta ensayos proteicos moleculares de citoplasma, secretoma y de membranas de *G. diazotrophicus*, pudimos concluir que la limitación en carbono y energía, así como también la condición de FBN generan cambios significativos en el perfil proteómico de este microorganismo lo que es coincidente con la expresión diferencial de enzimas y rutas metabólicas mostradas por *G. diazotrophicus* cuando fue cultivado en diferentes sistemas y/o medios de cultivo.

Más allá de lo antes expuesto, el objetivo principal de este trabajo fue estudiar la producción de polisacáridos extracelulares del tipo fructanos (levanos y FOS) por *G. diazotrophicus*. Dentro de este objetivo general se planteó la necesidad de conocer cómo varía la expresión de la levansacarasa (enzima responsable de la síntesis de dichos fructanos) buscando la/s condición/es nutricional/es de máxima actividad enzimática. El resultado de los cultivos realizados con la intención de cumplir con este objetivo nos llevaron a determinar que la condición nutricional en la cual *G. diazotrophicus* produce



la mayor concentración de LsdA en los sobrenadantes de los cultivos es cuando se utilizan las siguientes variables operacionales:

- cultivos batch limitados en carbono,
- bajo condiciones de FBN,
- sin control de pH.

Otro de los objetivos de este trabajo, que está incluido en el objetivo general, fue la optimización de un sistema de producción de fructanos tanto en cultivos batch del microorganismo, como en sistemas libres de células realizando incubaciones de extractos crudos de LsdA (sobrenadantes de los cultivos) en soluciones de diferentes concentraciones de sacarosa. Los resultados obtenidos indican que para la producción en masa de levanos la mejor estrategia es un sistema batch libre de células con las siguientes condiciones operacionales:

- sobrenadantes provenientes del crecimiento de *G. diazotrophicus* en un medio de cultivo conteniendo sacarosa,
- temperatura de incubación de 40 °C,
- relación enzima/sustrato alta,
- solución de sacarosa de 700 g/l
- tiempo de incubación de 72 h.

Por otro lado, para la obtención de FOS, el mejor sistema de producción encontrado fue un batch libre de células donde las condiciones operacionales están dadas por:

- sobrenadantes provenientes del crecimiento de *G. diazotrophicus* en un medio de cultivo conteniendo sacarosa,
- temperatura de incubación de 40 °C,
- relación enzima/sustrato baja,
- concentración de sacarosa de 700 g/l
- tiempo de incubación de 12 h.

Es claro que todas estas conclusiones surgen de estudios de producción de levanos, FOS y expresión de LsdA a escala de laboratorio. Estos resultados generalmente no son extrapolables directamente a un sistema de producción a gran escala, pero da un acercamiento al diseño de una estrategia de trabajo a este nivel. Por tanto, **estos**

**resultados pueden ser utilizados como punto de partida para el escalado de la producción a nivel industrial de fructanos (FOS y/o levanos) por *G. diazotrophicus* para su utilización como prebióticos en alimentación animal.**

En virtud de ello se plantean diferentes líneas de trabajos posteriores, entre las que podemos mencionar:

1. estudiar otros sistemas de cultivos, como el batch alimentado o pie de cuba que, por las características fisiológicas de la producción de levanos por *G. diazotrophicus* mostradas en este estudio, podrían llevar a un incremento de productividad (mejora en los rendimientos y acortamiento de los tiempos de proceso),
2. estudiar el comportamiento de preparados de FOS y levanos (juntos ó separados) como suplemento dietario en diferentes animales criados a corral,
3. Diseño y caracterización de una estrategia de “escalado” de las mejores condiciones de producción surgidas de este trabajo y, por último,
4. implementación de un proceso de recuperación y acondicionamiento de los diferentes productos obtenidos a nivel industrial.

# Capítulo 7:

## Referencias bibliográficas.



## 7.1. Referencias bibliográficas consultadas en el desarrollo de esta tesis:

- ✓ 2-D Electrophoresis. Principles and Methods. Handbook from GE Healthcare, Cat # 80-6429-60AC.
- ✓ Alvarez B., Martínez-Drets G. 1995. "Metabolic characterization of *Acetobacter diazotrophicus*." *Canadian Journal of Microbiology*, 41:918-924.
- ✓ Attwood MM., van Dijken JP., Pronk JT. 1991. "Glucose metabolism and gluconic acid production by *Acetobacter diazotrophicus*." *Fermentation and bioengineering*, 72:101-105.
- ✓ Arrieta, JG, Sotolongo M, Menéndez C, Alfonso D, Trujillo LE, Soto M, Ramírez R, Hernández L. 2004. "A type II protein secretory pathway required for levansucrase secretion by *Gluconacetobacter diazotrophicus*." *Journal of Bacteriology*, 186: 5031-5039.
- ✓ Baldani JI, Caruso L, Baldani VLD, Goi SR, Döbereiner J. 1997. "Recent advances in BNF with non-legume plants." *Soil biology and biochemistry*, 29:911-922.
- ✓ Bekers M., Laukevics J., Upite D., Kaminska E., Vigants A., Viesturs L., Danilevics A. 2002. "Fructooligosaccharide and levan producing activity of *Zymomonas mobilis* extracellular levansucrase." *Process Biochemistry*, 38: 701-706.
- ✓ Bergeron LJ., Morou-Bermudez E., Burne RA. 2000. "Characterization of the fructosyltransferase gene of *Actinomyces naeslundii* WVU45." *Journal of Bacteriology*, 182: 3649-3654.
- ✓ Bergmeyer HU, Bernt E. 1977. *Methods Enzym. Anal.* Vol. II: 1205-1212.
- ✓ Bertalan M., Alvano R., de Padua V., Rouws L., Rojas C., Hemerly A., Teixeira K., Schwab S., Araujo J., Oliveira A. 2009. "Complete genome sequence of the sugarcane nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5." *BMC Genomics*, 10: 450-
- ✓ Bezzate S., Aymerich S., Chambert R., Czarnes S., Berge O., Heulin T. 2000. "Disruption of the *Paenibacillus polymyxa* levansucrase gene impairs its ability to aggregate soil in the wheat rhizosphere." *Environmental Microbiology*, 2: 333-342.
- ✓ Biedrzycka E, Bielecka M. 2004. "Prebiotic effectiveness of fructans of different degrees of polymerization." *Trends in Food Science & Technology*, 15: 170-175.
- ✓ Blanco Y., Arroyo M., Legaz ME., Vicente C. 2005. "Isolation from *Gluconacetobacter diazotrophicus* cell walls of specific receptors for sugarcane glycoproteins, which act as recognition factors." *Journal of Chromatography A*, 1093: 204-211.
- ✓ Blanco Y., Blanch M., Piñon D., Legaz ME., Vicente C. 2005. "Antagonismo f *Gluconacetobacter diazotrophicus* (a sugarcane endosymbiont) against *Xanthomonas*

*albilineans* (pathogen) studied in alginate immobilized sugarcane stalk tissues.” *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99: 366-371.

- ✓ Bradford MM. 1976. “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.” *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- ✓ Boddey RM, Döbereiner J. 1991. “Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: Recent progress and perspectives for the future.” *Fertilizer Research*, 42: 241-250.
- ✓ Boddey RM., Oliveira OC., Urquiaga S., Reis VM., De Olivares FL., Baldani VLD., Döbereiner J. 1995. “Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: Contribution and prospects for improvement.” *Plant soil*, 174: 195-209.
- ✓ Boesch C., Treck J., Sievers M., Teuber M. 1998. “*Acetobacter intermedius*, SP. Nov. Systematic.” *Journal of Applied Microbiology*, 21: 220-229.
- ✓ Boiardi JL, Galar ML, Neijssel OM. 1996. “PQQ-linked extracellular glucose oxidation and chemotaxis towards this cofactor in rhizobia.” *FEMS Microbiology Letter*, 140: 179-184.
- ✓ Bulygina ES, Gulikova OM, Dikanskaya EM, Netrusov AI, Tourova TP, Chumakov KM. 1992. “Taxonomic studies of the genera *Acidomonas*, *Acetobacter* and *Gluconabacter* by 5S ribosomal RNA sequencing.” *Journal of General Microbiology*, 138: 2283-2286.
- ✓ Burris RH. 1994. “Comparative study of the response of *Azotobacter vinelandii* and *Acetobacter diazotrophicus* to changes in pH.” *Protoplasma*, 183: 62-66.
- ✓ Caballero-Mellado J, Fuentes-Ramírez LE, Reis VM, Martínez-Romero E. 1995. “Genetic structure of *Acetobacter diazotrophicus* populations and identification of a new genetically distant group.” *Applied Environmental Microbiology*, 61: 3008-3013.
- ✓ Causey TB., Shanmugam KT., Yomano LP., Ingram LO. 2004. “Engineering *Escherichia coli* for efficient conversion of glucose to pyruvate.” *National Academy of Sciences*, 101: 2235-2240.
- ✓ Cavalcante VA, Döbereiner J. 1988. “A new acid-tolerant nitrogen fixing bacterium associated with sugarcane.” *Plant soil*, 108: 23-31.
- ✓ Chaney AL., Marbach EP. 1962. “Modified reagents for determination of urea and ammonia.” *Clinical Chemistry*, 8: 130-132.
- ✓ Crittenden RG, Playne MJ. 1996. “Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides.” *Trends in Food Science & Technology*, 7: 353-361.
- ✓ Cote GL., Ahlgran JA. 1993. “Metabolism in microorganism Part I. Levan and levansucrase.” En *Science and Technology of Fructans*, pp. 141-168. Editado por Susuki M. y Chatterton NJ. Boca Raton FL: CRC Press.

- 
- ✓ De Ley J. 1966. "Dehydrogenases and reductases: 2-ketogluconic acid reductase." *Methods Enzymology*, 9: 196-206.
  - ✓ De Ley J, Gillis M, Swings J. 1984. "Family VI. *Acetobacteraceae*." En Krieg NR., Holt JG (Ed), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol 1, p. 267-278. Williams and Wilkins Baltimore.
  - ✓ Dixon R., Kahn D. 2004. "Genetic regulation of biological nitrogen fixation." *Nature Reviews Microbiology*, 2: 621-630.
  - ✓ Döbereiner J, Reis VM, Paula MA, Olivares FL. 1993. "Endophytes diazotrophicus in sugar cane, cereals and tuber plants." En R. Palacios, J Mora, e Newton (Ed), *New horizons in nitrogen fixation*, p. 671-676. Kluwer Academic Publishers Dordrecht.
  - ✓ Döbereiner J, Baldani VL, Reis VM. 1995. "Endophytic occurrence of diazotrophic bacteria in non-leguminous crop." En *Azoospirillum and Related Microorganisms*, PP 3-14. Edited by Fendrik I, Del Gallo M., Vandreyden J, Zamaroczy M. Berlin: Springer-Verlag.
  - ✓ Dong Z., Canny MJ., McCully ME., Roboredo MR., Cabadilla CF., Ortega E., Roders R. 1994. "A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems. A new role for the apoplast." *Plant Physiology*, 105: 1139-1147.
  - ✓ Dong Z., Heydrich M., Bernard K., McCully ME. 1995. "Further evidence that the N<sub>2</sub>-fixing endophytic bacterium from the intercellular spaces of sugarcane stems is *Acetobacter diazotrophicus*." *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 1843-1846.
  - ✓ Duine JA. 1991. "Quinoproteins: enzymes containing the quinonoid cofactor pyrroloquinoline quinone, topaquinone or tryptophan-tryptophan-quinone." *European Journal of Biochemistry*, 200: 271-284.
  - ✓ Dumas E., Desvaux M., Chambon C., Hérbraud M. 2009. "Insight into the core and variant exoproteomes of *Listeria monocytogenes* species by comparative subproteomic analysis." *Proteomics*, 9: 3136-3155.
  - ✓ Egener T, Hurek T, Reinhold-Hurek B. 1998. "Use of Green fluorescent protein to detect expression of *nif* genes of *Azoarcus* sp. BH72, a Grass-associated diazotrophicus, on Rice roots." *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11: 71-75.
  - ✓ Entani E, Ohmori S, Masai H, Suzuki K. 1985. "*Acetobacter polyoxogenes* sp. nov., a new species of an acetic acid bacterium useful for producing vinegar with high acidity." *Applied Microbiology*, 31: 475-490.
  - ✓ Ertola R., Yantorno O., Mignone C. 1994. "Microbiología industrial." Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos, Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico, Washington, D.C.
  - ✓ Flores-Encarnación M., Contreras-Zentella M., Soto-Urzuá L., Aguilar GR., Baca BE., Escamilla JE. 1999. "The respiratory system and diazotrophic activity of *Acetobacter diazotrophicus* PAL5." *Journal of Bacteriology*, 181: 6987-6995.

- 
- ✓ Franke IH, Fegan M, Hayward C, Leonard G, Stackebrandt E, Sly LI. 1999. "Description of *Gluconacetobacter sacchari* sp. nov., a new species of acetic acid bacterium isolated from the leaf sheath of sugar cane and from the pink sugar-cane mealy bug." *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49: 1681-1693.
  - ✓ Fuentes-Ramírez LE, Bustillos-Cristales R, Tapia-Hernández A, Jiménez-Salgado T, Wang ET, Martínez-Romero E, Caballero-Mellado J. 2001. "Novel nitrogen-fixing acetic acid bacteria, *Gluconacetobacter johannae* sp. nov., and *Gluconacetobacter azotocaptans* sp. nov., associated with coffee plants." *International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51: 1305-1314.
  - ✓ Galar ML., Boiardi JL. 1995. "Evidence for a membrane-bound pyrroloquinoline quinone-linked glucose dehydrogenase in *Acetobacter diazotrophicus*." *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43: 713-716.
  - ✓ Gallon JR. 1981. "The oxygen sensitivity of nitrogenase: a problem for biochemists and microorganisms." *Trends in Biochemical Sciences*, 6: 19-23.
  - ✓ Gallon JR. 1992. "Tansley review No. 44. Reconciling the incompatible: N<sub>2</sub> fixation and O<sub>2</sub>." *New Phytologist*, 122: 571-609.
  - ✓ Geier G., Geider K. 1993. "Characterization and influence of virulence of the levansucrase gene from the fireblight pathogen *Erwinia amylovora*." *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 42: 387-404.
  - ✓ Gills M, Kersters K, Hoste B., Janssens D, Kroppenstedt RM, Stephan MP, Teixeira KRS, Döbereiner J, De Ley J. 1989. "*Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a nitrogen-fixing acid bacterium associated with sugarcane." *International Journal Systematic and Evolutionary Bacteriology*, 39: 361-364.
  - ✓ González B., Martínez S., Chavez JL., Lee S., Castro NA., Domínguez MA., Gómez S., Contreras ML., Kennedy C., Escamilla JE. 2006. "Respiratory system of *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 evidence for a cyanide-sensitive cytochrome *bb* and cyanide-resistant cytochrome *ba* quinol oxidases." *Biochimica et Biophysica Acta* 1757: 1614-1622.
  - ✓ Griffin T., Smith L. 2000. "Single nucleotide polymorphism analysis by MALDI – TOF mass spectrometry." *TIBTECH*, 18: 77-84.
  - ✓ Hayashi S., Imada K., Kushima Y., Ueno H. 1989. "Observation of the chemical structure of fructooligosaccharide produced by an enzyme from *Aureobasidium* sp. ATCC 20524." *Current Microbiology* 19: 175-177.
  - ✓ He CF., Wang YM., 2008. "Protein extraction from leaves of *Aloe vera* L., a succulent and recalcitrant plant for proteomic analysis." *Plant Molecular Biology Reporter*, 26: 292-300.
  - ✓ Herbert D. 1958. "Some principles of continuous culture." En: Recent progress in Microbiology. Symp. VII Int. Congr. Microbiol., pp 381-396.

- 
- ✓ Herbert D., Phipps PJ., Tempest DW. 1965. "The chemostat: Design and instrumentation." *Laboratory Practice*, 14: 1150-1161.
  - ✓ Herbert D., Phipps PJ., Strange RE. 1971. "Chemical analysis of microbial cells." *Methods Microbiology*, 5B: 265-272
  - ✓ Hernández L., Arrieta J., Menéndez C., Vazquez R., Coego A., Suarez V., Selman G, Petit-Glatron MF, Chambert R. 1995. "Isolation and enzymic properties of levansucrase secreted by *Acetobacter diazotrophicus* SRT4, a bacterium associated with sugar cane." *Biochemical Journal*, 118: 113-118.
  - ✓ Hernández L., Arrieta J., Betancourt L., Flacón V., Madrazo J., Coego A., Menéndez C. 1999a. "Levansucrase from *Acetobacter diazotrophicus* SRT4 is secreted via periplasm by a signal-peptide-dependent pathway." *Current Microbiology*, 39: 146-152.
  - ✓ Hernández L. 1999b. "Levanasacarasa de *Acetobacter diazotrophicus*: identificación y caracterizaciones bioquímica y genética." Tesis doctoral. Ciudad de La Habana, Cuba.
  - ✓ Hernández L., Sotolongo M., Rosabal Y., Menéndez C., Ramírez R., Caballero-Mellado J., Arrieta J. 2000. "Structural levansucrase gene (*lsdA*) constitutes a functional locus conserved in the species *Gluconacetobacter diazotrophicus*." *Archives of Microbiology*, 174: 111-119.
  - ✓ Hettwer U., Jaeckel FR., Boch J., Meyer M., Rudolph K., Ullrich MS. 1998. "Cloning nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of levansucrase genes from the plant pathogens *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* and *P. syringae* pv. *phaseolicola*." *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 3180-3187.
  - ✓ Hill S. 1971. "Influence of oxygen concentration on the colony type of *Derxia gummosa* grow on nitrogen-free médium." *Journal of General Microbiology*, 67: 77-83.
  - ✓ Hill S. 1988. "How is nitrogenase regulated by oxygen?." *FEMS Microbiology Reviews*, 34: 111-130.
  - ✓ Holt JG., Krieg NR., Sneath PHA., Staley JT., Williams ST. 1994. "*Genus Acetobacter and Gluconobacter*." *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 19th edn. Williams and Wikens, MD, USA, pp. 71, 84.
  - ✓ Hoskisson PA., Hobbs G. 2005. "Continuous culture – making a comeback?." *Microbiology*, 151: 3153-3159.
  - ✓ Intorne AC., Vinicius M., Oliveira V., Lima ML., da Silva JF., Olivares FL., de Souza (h) GA. 2009. "Identification and characterization of *Gluconacetobacter diazotrophicus* mutants defective in the solubilization of phosphorus and zinc." *Arch Microbiol*, 191: 477-483.
  - ✓ ImageMaster 2D Platinum 7.0. User Manual 2008. GE Healthcare Cat# 28-9381-02 AA.



- 
- ✓ James EK, Olivares FL. 1997. "Infection and colonization of sugar cane and other gramineous plants by endophytic diazotrophs." *Critical Reviews Plant Sciences*, 17: 77-119.
  - ✓ James EK. 2000. "Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis." *Field Crops Research*, 65: 197-209.
  - ✓ Jiménez-Salgado T, Fuentes-Ramírez LE, Tapia-Hernández A, Mascarúa-Esparza MA, Martínez-Romero E, Caballero-Mellado J. 1997. "*Coffea arabica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus*, and isolation of other nitrogen-fixing acetobacteria." *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 3676-3683.
  - ✓ Jørgensen H., Nielsen J., Villadsen J., Mølgaard H. 1995. "Metabolic flux distributions in *Penicillium chrysogenum* during fed-batch cultivations." *Biotechnology Bioengineering*, 46: 117-131.
  - ✓ Kawasaki Shi 1982. "Neosugar User's guide", Meiji Seika Co. Japan.
  - ✓ Lay JO. 2002. "MALDI-TOF Mass spectrometry of bacteria." *Mass Spectrometry Reviews*, 20: 172-194.
  - ✓ Lee S., Sevilla M., Reth A., Meletzus D., Gunapala N., Kennedy C. 2000. "Characterization of nitrogen fixation genes and plant-growth promoting properties in *Acetobacter diazotrophicus*, an endophyte of sugarcane." En: Stacey G., Keen NT (Eds.) *Plant-Microbe Interactions*, APS Press, St. Paul, PP 297-314.
  - ✓ Leigh JÁ, Coplin DL. 1992. "Exopolysaccharides in plant-bacterial interactions." *Annual Review of Microbiology*, 46: 307-346.
  - ✓ Le Roy K., Lammens W., Verhaest M., De Coninck B., Rabijns A., van Laere A., van den Ende W. 2007. "Unraveling the difference between invertases and fructan exohydrolases: A single amino acid (Asp-239) substitution transforms Arabidopsis cell wall invertase1 into a fructan 1-exohydrolase" *Plant Physiology*, 145: 616-625.
  - ✓ Lery LMS., Coelho AMA., Von Krüger WMA., Gonçalves MS., Valente RH., Santos EO., Rocha SL., Perales J., Domont GB., Teixeira KRS., Bisch PM. 2008 a. "Protein expression profile of *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5, a sugarcane endophytic plant growth-promoting bacterium." *Proteomics*, 8: 1631-1644.
  - ✓ Lery, LMS., Von Krüger WMA., Viana FC., Teixeira KRS., Bisch PM. 2008 b. "A comparative proteomic analysis of *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 at exponential and stationary phases of cultures in the presence of high and low levels of inorganic nitrogen compound." *Biochimica et Biophysica Acta – Proteins and Proteomics*, 1784: 1578-1589.
  - ✓ Lessie TG., Phibbs PV. 1984. "Alternative pathways of carbohydrates utilization in *Pseudomonas*." *Annual Review of Microbiology*, 38: 359-387.
  - ✓ Li RP., MacRae IC. 1991. "Specific association of diazotrophic acetobacters with sugarcane." *Soil biology & Biochemistry*, 23: 999-1002.

- 
- ✓ Li Y., Triccas JA., Ferenci T. 1997. "A novel levansucrase-levanase gene cluster in *Bacillus stearothermophilus* ATCC12980." *Biochimica et Biophysica Acta – Gene structure and expression*, 1353: 203-208.
  - ✓ Li H., Ullrich MS. 2001. "Characterization and mutational analysis of three allelic *lsc* genes encoding levansucrase in *Pseudomonas syringae*." *Journal of Bacteriology*, 183: 3282-3292.
  - ✓ Lin J., Lee SM., Lee HJ., Koo YM. 2000. "Modeling of typical microbial cell growth in batch culture." *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 5: 382-285.
  - ✓ Lingyun W., Jianhua W., Xiaodong Z., Da T., Yalin Y., Chenggang C., Tianhua F., Fan Z. 2007. "Studies on the extracting technical conditions of inulin from Jerusalem artichoke tubers." *Journal of Food Engineering* 79: 1087-1093.
  - ✓ Luna MF., Mignone CF., Boiardi JL. 2000. "The carbon source influences the energetic efficiency of the respiratory chain of N<sub>2</sub>-fixing *Acetobacter diazotrophicus*." *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54: 564-569.
  - ✓ Luna MF., Bernardelli MC., Mignone CF., Boiardi JL. 2002. "Energy generation by extracellular aldose oxidation in N<sub>2</sub>-fixing *Gluconacetobacter diazotrophicus*." *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 2054-2056.
  - ✓ Luna MF. 2003. "Características fisiológicas de *Gluconacetobacter diazotrophicus*: importancia funcional de la oxidación periplasmática de aldosas." Tesis doctoral. Ciudad de La Plata, Argentina.
  - ✓ Luna MF., Bernardelli MC., Galar ML., Boiardi JL. 2006. "Glucose metabolism in batch and continuous cultures of *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL 3." *Current Microbiology*, 52: 163-168.
  - ✓ Luna MF, Boiardi JL. 2008. "Growth yields and glucose metabolism of N<sub>2</sub>-fixing *Gluconacetobacter diazotrophicus* at different culture pH values." *World Journal Microbiology and Biotechnology*, 24: 587-590.
  - ✓ Luttk MAH., Van Spanning R., Schipper D., Van Dijken JP., Pronk JT. 1997. "The low biomass yields of the acetic acid bacterium *Acetobacter pasteurianus* are due to a low stoichiometry of respiratory-coupled proton translocation". *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 3345-3351.
  - ✓ Martinez-Fleites C., Ortiz-Lombardia M., Pons T., Tarbouriech N., Taylor EJ., Arrieta JG., Hernandez L., Davies GJ. 2005. "Crystal structure of levansucrase from the Gram-negative bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*." *Biochemical Journal*, 390: 19-27.
  - ✓ Matsushita K., Ameyama M. 1982. "D-Glucose dehydrogenase from *Pseudomonas fluorescens*, membrane bound." *Methods in Enzymology*, 89: 149-155.

- 
- ✓ Matsushita K., Shinagawa E., Ameyama M. 1982. D-gluconate dehydrogenase from bacteria, 2-keto-D-gluconate yielding, membrane bound.” *Methods in Enzymology*, 89: 187-193.
  - ✓ Menéndez C., Hernández L., Banguela A., País J. 2004. “Functional production and secretion of the *Gluconacetobacter diazotrophicus* fructose-releasing exo-levanase (LsdB) in *Pichia pastoris*.” *Enzyme and Microbial Technology*, 34: 446-452.
  - ✓ Menéndez C., Banguela A., Caballero-Mellado J., Hernández L. 2009. “Transcriptional regulation and signal-peptide dependent secretion of exolevanase (LsdB) in the endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus*.” *Applied and Environmental Microbiology*, 75: 1782-1785.
  - ✓ Monod J. 1949. “The growth of bacterial cultures.” *Annual Review of Microbiology*, 3: 371-193.
  - ✓ Muñoz-Rojas J., Fuentes-Ramírez LE., Caballero-Mellado J. 2005. “Antagonism among *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains in culture media and in endophytic association.” *FEMS Microbiology Ecology*, 54: 57-66.
  - ✓ Mussatto, SI and Mancilha IM. 2007. “Non-digestible oligosaccharides: A review.” *Carbohydrate Polymers*, 68: 587-597.
  - ✓ Neijssel OM., Tempest DW. 1979. “The physiology of metabolite over-production.” En: *Microbial technology: current state, future prospects*, pp 53-82. Ed: Bull AT, Ellwood DC y Ratledge C, Cambridge University Press Cambridge.
  - ✓ Nielsen J. 2001. “Metabolic engineering.” *Applied Microbiology Biotechnology*, 55: 263-283.
  - ✓ Nyman TA. 2001. “The role of mass spectrometry in proteome studies.” *Biomolecular Engineering*, 18: 221- 227.
  - ✓ Pan BO., Vessey JK. 2001. “Response of the endophytic diazotroph *Gluconacetobacter diazotrophicus* on solid media to changes in atmospheric partial O<sub>2</sub> pressure.” *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 4694-4700.
  - ✓ Park J., Oh T., Yun JW. 2001. “Purification and characterization of a novel transfructosylating enzyme from *Bacillus macerans* EG-6.” *Process Biochemistry*, 37: 471-476.
  - ✓ Paula MA, Reis VM, Döbereiner J. 1991. “Interaction of *Glomus clarum* with *Acetobacter diazotrophicus* in infection of sweet potato (*Ipomoea batatas*), sugarcane (*Saccharum spp.*), and sweet sorghum (*Sorghum vulgare*.)” *Biology and Fertility of Soils*, 11: 111-115.
  - ✓ Paula MA, Urquiaga S, Siqueira JO, Döbereiner J. 1992. “Synergistic effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and diazotrophic bacteria on nutrition and growth of sweet potato (*Ipomoea batatas*.)” *Biology and Fertility of Soils*, 14: 61-66 36.

- 
- ✓ Piñón D., Casas M., Blanch M., Fontaniella B., Blanco Y., Vicente C., Solas MT., Legaz ME. 2002. “*Gluconacetobacter diazotrophicus*, a sugar cane endosymbiont, produces a bacteriocin against *Xanthomonas albilineans*, a sugar cane pathogen.” *Research in Microbiology*, 153: 345-351.
  - ✓ Polati, R. 2009. “A CTAB based method for the preparation of total protein extract of wine spoilage microorganisms for proteomic analysis.” *Proteins*, 877: 887-891.
  - ✓ Ramos JR., Robson RL. 1985 a. “Isolation and properties of mutants of *Azotobacter chroococcum* defective in aerobic nitrogen fixation.” *Journal of General Microbiology*, 131: 1449-1458.
  - ✓ Ramos JR., Robson RL. 1985 b. “Lesions in citrate synthase that affect aerobic nitrogen fixation by *Azotobacter chroococcum*.” *Journal of Bacteriology*, 162: 746-751.
  - ✓ Rathsam C., Giffard PM., Jacques NA. 1993. “The cell-bound fructosyltransferase of *Streptococcus salivarius*: the carboxyl terminus specifies attachment in a *Streptococcus gordonii* model system.” *Journal of Bacteriology*, 175: 4520-4527.
  - ✓ Reberfroid M, Slavin J. 2000. “Nondigestible oligosaccharides.” *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40: 461-480.
  - ✓ Reinhold-Hurek B., Hurek T. 1998. “Life in grasses: diazotrophic endophytes.” *Trends in Microbiology*, 6: 139-144
  - ✓ Reis VM y Döbereiner J. 1998. “Effect of high sugar concentration on nitrogenase activity of *Acetobacter diazotrophicus*.” *Archives of Microbiology*, 171: 13-18.
  - ✓ Rippka R., Deryelles J., Waterbury JB., Herdman M., Stanier RY. 1979. “generic assignments, strain histories and properties of pure culture of cyanobacteria.” *Journal of general Microbiology*, 111: 1-61.
  - ✓ Rivero-Urgell M, Santamaria-Orleans A. 2001. “Oligosaccharides: Application in infant food.” *Early Human Development*, 65: S43-S52.
  - ✓ Roberfroid MB. 1996. “Functional effects of food components and the gastrointestinal system: Chicory fructo-oligosaccharides.” *Nutrition Reviews*, 54: S38-S42.
  - ✓ Roels JA. 1983. “Energetics and kinetics in biotechnology.” Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, The Netherlands.
  - ✓ Russell J.B., Cook G.M. 1995. “Energetics of bacterial growth: balance of anabolic and catabolic reactions.” *Microbiology Reviews* 59: 48-62.
  - ✓ Saengthongpinit W., Sajjaanantakul T. 2005. “Influence of harvest time and storage temperature on characteristics of inulin from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers.” *Postharvest Biology and Technology* 37: 93-100.

- 
- ✓ Saito K., Yokota A., Tomita F. 1997. "Molecular cloning of levan fructotransferase gene from *Arthrobacter nicotinavorans* GS-9 and its expression in *Escherichia coli*." *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 61: 2076-2079.
  - ✓ Sangeetha PT., Ramesh MN., Prapulla SG. 2005. "Recent trends in microbial production, analysis and application of fructooligosaccharides." *Trends in Food & Technology*, 16: 442-457.
  - ✓ Saravanan VS., Madhaiyan M., Thangaraju M. 2007. "Solubilization of zinc compounds by the diazotrophic, plant growth promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*." *Chemosphere*, 66: 1794-1798.
  - ✓ Saravanan VS., Madhaiyan M., Osborne J., Thangaraju M., Sa TM. 2008. "Ecological occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and nitrogen-fixing *Acetobacteraceae* members: Their possible role in plant growth promotion." *Microbial ecology*, 55: 130-140.
  - ✓ Sevilla M., Meletzus D., Teixeira K., Lee S., Nutakki A., Baldani I., Kennedy C. 1997. "Analysis of *nif* and regulatory genes in *Acetobacter diazotrophicus*." *Soil Biology and Biochemistry*, 29: 871-874.
  - ✓ Sevilla M., Burris RH., Gunapala N., Kennedy C. 2001. "Comparison of benefit to sugarcane plant growth and  $^{15}\text{N}_2$  incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and *nif* mutant strains." *Molecular Plant Microbe Interactions*, 14: 358-366.
  - ✓ Shewchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M. 1996. "Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels." *Analytical Chemistry*, 68: 850-858.
  - ✓ Sievers M., Ludwig W., Teuber M. 1994. "Phylogenetic positioning of *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Rhodospila* and *Acidiphilium* species as a branch of acidophilic bacteria in the alpha-subclass of proteobacteria based on 16S ribosomal RNA sequences." *Systematica and Applied Microbiology*, 17: 189-196.
  - ✓ Slavin JL. 1999. "Health benefits of oligosaccharides." *Journal of Nutraceuticals, Functional and Medical Foods*, 1: 43-55.
  - ✓ Sokollek SJ, Hertel C, Hammes WP. 1998. "Description of *Acetobacter oboediens* sp. nov. and *Acetobacter pomorum* sp. nov., two new species isolated from industrial vinegar fermentations." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 48: 935-940.
  - ✓ Song KB., Joo HK., Rhee SK. 1993. "Nucleotide sequence of levansucrase gene (*levU*) of *Zymomonas mobilis* ZM1 (ATCC10988)." *Biochimica et Biophysica Acta – Gene Structure and Expression*, 1173: 320-324.
  - ✓ Song KB., Seo JW., Kim MG., Rhee SK. 1998. "Levansucrase of *Rahnella aquatilis* ATCC33071. Gene cloning, expression and levan formation." *Annual of New York Academy of Sciences.*, 864: 506-511.

- 
- ✓ Soto-Cruz O., Páez-Lerma J. 2005. "Fermentation process balances: consistency and metabolic flux analysis." *Revista Mexicana de Ingeniería Química (AMIDIQ)*, 4: 59-74.
  - ✓ Sprent J.I., James E.K. 1995. "N<sub>2</sub>-fixation by endophytic bacteria: questions of entry and operation." p 15-30 En I. Fendrik, M. del Gallo, J. Vanderleyden, M. de Zamaroczy, (ed), *Azospirillum VI and related microorganism*. Berlin, Springer-Verlag.
  - ✓ Steinmetz M., Le Coq D., Aymerich S., Gonzy-Treboul G., Gay P. 1985. "The DNA sequence of the gene for the secreted *Bacillus subtilis* enzyme levansucrase and its genetic control sites." *Molecular Genetics and Genomics*, 200: 220-228.
  - ✓ Stephan M.P., Oliveira M., Teixeira K.R.S., Martínez-Drets G. 1991. "Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*." *FEMS Microbiology Letters*, 77: 67-72.
  - ✓ Stephanopoulos G., Nielsen J., Aristidou A. 1998. "Metabolic engineering. Principles and methodologies." Academic Press, Nueva York.
  - ✓ Swings J. 1992. "The genera *Acetobacter* and *Gluconobacter*." p. 2268-2286. En A Balows, HG Trüper, M Dworkin, W Harder, KH Schleifer. (ed.), *The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications*, Vol. III. Springer-Verlag, New York, NY.
  - ✓ Tajima K., Tanio T., Kobayashi Y. Kohno H., Fujiwara M., Shiba T., Erata T., Munekata M., Takai M. 2000. "Cloning and sequencing of the levansucrase gene from *Acetobacter xylinum* NCI 1005." *DNA Research*, 7: 237-242.
  - ✓ Tang LB., Lenstra R., Borchert TV., Nagarajan V. 1990. "Isolation and characterization of levansucrase-encoding gene from *Bacillus amylolicuefaciens*." *Gene*, 96: 89-93.
  - ✓ Tapia-Hernández A, Bustillos-Cristales MR, Jiménez-Salgado T, Caballero-Mellado J, Fuentes-Ramírez LE. 2000. "Natural endophytic occurrence of *Acetobacter diazotrophicus* in pineapple plants." *Microbial Ecology*, 39: 49-55.
  - ✓ Teixeira KRS., Wulling M., Morgan T., Galler R., Zellermann EM., Baldani JJ., Kennedy C., Meletzus D. 1999. "Molecular analysis of the chromosomal region encoding the *nifA* and *nifB* genes of *Acetobacter diazotrophicus*." *FEMS Microbiology Letters*, 176: 301-109.
  - ✓ Tejera NA., Ortega E., Rodés R., Lluch C. 2004. "Influence of carbón and nitrogen sources on growth, nitrogenase activity, and carbon metabolism of *Gluconacetobacter diazotrophicus*." *Canadian Journal of Microbiology* 50: 745-750.
  - ✓ Tempest DW. 1970. "The continuous cultivation of micro-organisms. I. Theory of the chemostat." En: Norris J R, Ribbons DW. (Eds) *Methods in Microbiology*, Acad. Press, London, New York, pp 259

- 
- ✓ Trujillo Toledo LE., Gómez Riera R., Banguela Castillo A., Soto Romero M., Arrieta Sosa JG., Hernández García L. 2004. "Catalytical properties of N-glycosylated *Gluconacetobacter diazotrophicus* levansucrase produces in yeast." *Electronic Journal of Biotechnology*, ISSN: 0717-3458.
  - ✓ Urakami T., Tamaoka J., Susuki K.I. 1989. "*Acidomonas* gen. nov., Incorporation *Acetobacter methanolicus* as *Acidomonas methanolica* comb. nov." *International Journal of Systematic Bacteriology*, 39: 50 – 55.
  - ✓ Ureta A., Alvarez B., Ramón A., Vera MA., Martínez-Drets G. 1995. "Identification of *Acetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae* and *Herbaspirillum rubrisubaldicans* using biochemical and genetic criteria." *Plant Soil*, 172: 271-277.
  - ✓ Ureta A., Nordlund S. 2002. "Evidence for conformational protection of nitrogenase against oxygen in *Gluconacetobacter diazotrophicus* by a putative FeSII protein." *Journal of Bacteriology*, 184: 5805-5809.
  - ✓ van Hijum SA., Szalowska E., van der Maarel MJ., Dijkhuizen L. 2004. "Biochemical and molecular characterization of levansucrase from *Lactobacillus reuteri*." *Microbiology*, 150: 621-630.
  - ✓ Varma A., Parsson BO. 1994. "Metabolic flux balancing: basic concepts, scientific and practical use." *Biotechnology*, 12: 994-998.
  - ✓ Voragen AGJ. 1998. "Technological aspects of functional food-related carbohydrates." *Trends in Food Science & Technology*, 9: 328-335
  - ✓ Waterhouse AL., Chatterton NJ. 1993. "Glossary of fructan terms. In: Suzuki M, Chatterton NJ. Editors." *Science and technology of fructans*. 1-7.
  - ✓ Wunschel SC., Jarman KH., Petersen CE., Valentine NB., Wahl KL. 2005. "Bacterial analysis by MALDI-TOF mass spectrometry: An inter-laboratory comparison." *Journal of the American Society of Mass Spectrometry*, 16: 456-462.
  - ✓ Yamada Y, Hoshino K, Ishikawa T. 1997. "The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: The elevation of the subgenus *Gluconoacetobacter* to the generic level." *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 61: 1244-1251.
  - ✓ Yamada Y, Hoshino K, Ishikawa T. 1998. "*Gluconacetobacter* nom. corrig. (*Gluconoacetobacter* [sci]). In Validation of publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB, List no. 64." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 48: 327-328.
  - ✓ Yamada Y, Katsura K, Kawasaki H, Widyastuti Y, Saono S, Seki T, Uchimura T, Komagata K. 2000. "*Asaia bogorensis* gen. nov., sp. nov., an unusual acetic acid bacterium in the  $\alpha$ -Proteobacteria." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50: 823-829.

- ✓ Yates MG. 1987. "The role of oxygen and hydrogen in nitrogen fixation." En *The Nitrogen and Sulphur Cycles* ed. By Cole JA y Ferguson S, pp 383-416. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- ✓ Yun JW. 1996. "Fructooligosaccharides-Occurrence, preparation and application." *Enzyme and Microbial Technology*, 19: 107-117.
- ✓ Young JPW. 1992. "Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organism." p. 43-86. En G Stacey, RH Burris, H J Evans (Ed.), *Biological Nitrogen Fixation*. Chapman & Hall, New York.