

00557



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

PRODUCCION DE LA ISOMALTULOSA SINTASA DE
Protaminobacter rubrum NRRL B-2348

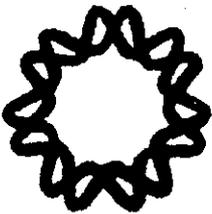
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRIA EN CIENCIAS *Bioquímicas*

P R E S E N T A

Q. A. LARIZA TINOCO VALDEZ



CUERNAVACA, MORELOS

2000



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Siento que es un buen día para escribir el prólogo: Domingo 6^o de febrero de 2000. Nueve meses y dieciséis días han transcurrido desde que inició el paro en la UNAM. Para muchos, ya era hora, ya era justo "terminar" con el problema, al costo que fuera, no importando que no se resolviera lo que por más de nueve meses estuvo en discusión sin llegar siquiera a algún arreglo coherente o de menos plantear las bases para una solución que beneficiara a nuestra Alma mater, no al CGH, no al Rector (mal llamado la máxima autoridad de la UNAM), pero tal parece que en nuestro país eso está muy lejos de suceder; resulta más importante que las primeras planas de los periódicos y los espacios en los noticieros de televisión los ocupen Labastida, Fox, Cárdenas, etc... y no los mugrosos, nacos del CGH (como algunos osan llamarlos sin antes verse en el espejo). Dentro de mi decepción e impotencia por ver a este país sumido en la miseria (aunque los números macroeconómicos digan lo contrario), el subdesarrollo, la violencia, la impunidad y la injusticia, yo ludo por ser un poco mejor a nivel personal y profesional, para ayudar en algo a mi México... pero cuando uno ve la enorme manipulación de la información, la prepotencia, la intransigencia y abuso de autoridad, siente que se van los ideales y sueños de entre las manos.

Lo único que me queda por hacer, es ahorrar, para que algún día si mis hijos desean estudiar en alguna universidad, yo pueda darles ese "privilegio" que desde hoy se está planteando, sin que el hecho de pagar una colegiatura sea garantía de educación de excelencia.

A cambio, mis impuestos, al igual que los de todos los mexicanos se siguen utilizando en los super viajes de los políticos, en rescatar bancos quebrados, en sensacionales campañas políticas avaladas por una democracia virtual y no en cosas inútiles como mantener a la Universidad, al fin, solo basta "ponerse las pilas" para encontrar trabajo... como no lo había pensado, ahí esta la clave del éxito y el futuro de nuestro país.

Para todos aquellos ilusos como yo que conservan la esperanza de que algún día este país saldrá de la miseria y el tercermundismo. Hagamos algo por México.

Lariza.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca crédito 118118 otorgada para realizar los estudios de maestría en el período Septiembre 1997 a Agosto 1999.

A la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM, por el complemento de beca otorgado para realizar los estudios de maestría en el período Febrero 1998 a Julio 1999.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por formarme como persona y profesional, por su gran riqueza cultural y social, por ser la única universidad que forma personas críticas y conscientes de su realidad...

Al Instituto de Biotecnología, por ser protagonista de mi formación profesional en estos últimos 3 años.

Al Dr. Agustín López-Munguía, por ser toda una institución, por tu incondicional apoyo, consejos y entusiasmo durante los tres años que estuve en el Ibt. Gracias por ayudarme a lograr esta gran meta. Gracias ser tan sencillo pese a tu grandeza...

A los miembros de mi comité tutorial, quienes a lo largo de dos años guiaron el desarrollo de mi trabajo con opiniones invaluable, con mi entera gratitud, a:
Dr. Agustín López-Munguía, Dr. Guillermo Gosset, Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez y Dr. Antonio de León.

A los miembros del jurado, que pusieron los puntos finales en mi trabajo. Gracias por sus opiniones y diferentes enfoques que lo enriquecieron tanto:
Dra. Guadalupe Espín, Dr. Rafael Vázquez, Dr. Enrique Merino, Dra. Amelia Farrés y Dr. Agustín López-Munguía.

Al T.L. Fernando González, un gran amigo a quien le debo muchas horas aménas de trabajo y conocimiento invaluable; siempre dispuesto a ayudarme. Gracias por tanto días felices en el laboratorio...

Al Dr. Takuya, por tu increíble e incondicional ayuda en la traducción de los artículos escritos en japonés.

Dedicatorias

A mis padres. Por tanto que me han dado: amor, paciencia, educación y tiempo de manera inagotable e incondicional. Sinceramente espero poder corresponder a ello con creces, ya que todo lo que soy se los debo a ustedes.

A mi hermana. Por estar siempre ahí, escucharme y aguantarme en mis sesiones de histeria, nervios y desvelos, eres genial!

A Arri, Edgar y Blanca. Porque pese a la distancia física, nos encontramos muy cerca uno de otro logrando nuestras propias metas, compartiendo anécdotas y momentos difíciles a través del internet. Gracias por alegrarme cada mañana con sus mensajes.

A la Barbus, simplemente por ser una verdadera amiga.

A Mónica, por incorporarte a la terna, a los tacos y los viboreos...

A Enrique y Carmen. Por todas esas tardes y noches de esparcimiento en Cuerna, por compartirnos algo tan bello como Enriquito.

A la Dolores, Vanesa, Mauricio, Marce, Gabriel, Humberto cómplices de la maestría, desde el examen de admisión hasta hoy. Que inolvidables exámenes, seminarios, torturiales, etc... Gracias por estar ahí.

A los señores Porras. Por su cálida hospitalidad durante dos años, por su gentileza y gran calor humano en esta hermosa e inolvidable estancia en Cuernavaca.

A los demás integrantes del equipo: los López team, a los hermanitos Vázquez y a la demás "pipol" del instituto, que de alguna u otra forma enriquecieron mis vivencias.

A Isabel, siempre constante, presente en todas las etapas de mi vida. Gracias por tu incondicional amistad.

A toda mi gran familia: los Valdez, los Tinoco, ahora también los Arroyo y los Torres. A los amigos de Yaute que también son una familia, a los amigos de Gus que ya son mis amigos, por ser parte de mi vida y compartir mis logros.

Agradecimientos

A la Q.A. **Blanca Yumbe**, por tu colaboración en la búsqueda de artículos desde Japón!!!

A **Shirley Ainsworth**, por todo tu apoyo en las referencias bibliográficas, gracias por ser tan profesional y siempre dispuesta.

Al C.P. **Eusebio González**, por tu valiosísimo apoyo económico que me permitió iniciar este proyecto que hoy es una realidad. Mil gracias de verdad.

A mi tío, Lic. **Paco Valdez**, por ayudarme a culminar este trabajo con el proceso de impresión.

A la Sra. **Mayela Dingler**, por tan valiente obra que realizas día con día. Por tu buena voluntad en los engorrosos pero tan necesarios trámites burocráticos. Pero mucho más, gracias por tu amistad...

Finalmente, el broche de oro, mi marido! Que significa tantas cosas bellas e indescritibles en estos cuatro años de conocerlo y dos de estar juntos. **GUS:** Gracias por todos tus consejos, clases de molecular, asesorías pre-tutoriales, todo lo que implicó la escuela; pero millones de gracias más por ser mi complemento, por todas tus travesuras que dan alegría a mis días, por tu paciencia, apoyo y amor infinitos, por tus consejos en momentos difíciles, por compartir tu vida conmigo y con la esperanza de seguir juntos hasta el último día posible.

ÍNDICE GENERAL

	PAGINAS
ÍNDICE DE TABLAS.	IV
ÍNDICE DE FIGURAS.	V
RESUMEN.	1
I.- INTRODUCCIÓN.	2
II.- OBJETIVOS.	
2.1. Objetivo general.	4
2.2. Objetivos específicos.	4
III.- ANTECEDENTES.	
3.1. La sacarosa como materia prima.	5
3.2. La isomaltulosa.	7
3.2.1. Procesos de producción.	7
3.2.2. Características fisicoquímicas.	8
3.2.3. Microorganismos productores de isomaltulosa.	11
a) <i>Protaminobacter rubrum</i> .	12
3.2.4. Su función adaptativa en microorganismos.	14
a) Fuente de carbono y energía secuestradas.	15
b) Metabolismo alterno en limitación de nutrientes.	15
c) Osmoprotector.	17
d) Transporte de azúcares.	18
3.2.5. Aplicaciones potenciales.	19
a) Como sustituto de la sacarosa.	20
b) Metabolismo de la isomaltulosa en ratas y humanos.	20

3.3. La enzima isomaltulosa sintasa.	21
3.3.1. Características generales.	22
3.3.2. Mecanismos de reacción.	25
a) <i>Erwinia rhapsodici</i> .	25
b) <i>Protaminobacter rubrum</i> .	28
3.3.3. Producción de la enzima.	30
3.3.4. Especificidad de la enzima.	31

IV.- MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1. Reactivos y equipos utilizados.	34
4.1.1. Reactivos.	34
4.1.2. Equipos.	34
4.2. Técnicas analíticas empleadas.	35
4.2.1. Cuantificación de isomaltulosa por el método del Ácido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS).	35
4.2.2. Determinación de actividad isomaltulosa sintasa por el método de DNS.	36
4.2.3. Determinación de proteína total por el método de Lowry.	37
4.2.4. Identificación de productos por Cromatografía en Capa Fina (CCF).	38
4.2.5. Identificación y cuantificación de productos por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).	38
4.2.6. Determinación de peso seco	39
4.3. Procedimiento experimental.	40
4.3.1. Almacenamiento de la cepa productora de isomaltulosa sintasa.	40
4.3.2. Fermentaciones utilizando diferentes fuentes de carbono.	40
a) Toma de muestra.	42
b) Reacciones de síntesis de isomaltulosa.	42
4.3.3. Fermentación en dos etapas.	43
4.3.4. Reacciones empleando diferentes sustratos.	43

V.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	
5.1. Estabilidad de la cepa.	44
5.2. Crecimiento de <i>P. rubrum</i> en el medio de cultivo reportado en la literatura.	44
5.3. Fermentaciones utilizando diferentes fuentes de carbono.	45
5.3.1. Crecimiento de <i>P. rubrum</i> en glucosa.	45
5.3.2. Crecimiento de <i>P. rubrum</i> en fructosa.	47
5.3.3. Crecimiento de <i>P. rubrum</i> en sacarosa.	48
5.3.4. Crecimiento de <i>P. rubrum</i> en isomaltulosa.	50
5.3.5. Control negativo sin fuente de carbono.	51
5.3.6. Crecimiento de <i>P. rubrum</i> en maltosa.	52
5.3.7. Efecto de la preparación del preinóculo.	54
5.3.8. Fermentaciones con sustratos combinados.	55
a) Crecimiento de <i>P. rubrum</i> en glucosa y fructosa.	55
b) Crecimiento de <i>P. rubrum</i> en glucosa e isomaltulosa.	57
c) Crecimiento de <i>P. rubrum</i> en glucosa y sacarosa.	59
5.3.9. Análisis comparativo de los niveles de actividad <i>ims</i> con diferentes fuentes de carbono.	61
5.4. Fermentación en dos etapas.	63
5.5. Estudio cinético.	65
5.6. Reacciones con diferentes sustratos.	68
VI.- CONCLUSIONES.	71
VII.- PERSPECTIVAS.	73
VIII. BIBLIOGRAFÍA.	74
APÉNDICE I.	82

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA	TITULO	PAGINAS
I	Edulcorantes alternativos a la sacarosa.	6
II	Propiedades físicas de la isomaltulosa.	10
III	Microorganismos productores de isomaltulosa.	12
IV	Resumen de las características generales de las isomaltulosa sintasa de los principales microorganismos productores de isomaltulosa.	24
V	Medios de cultivo empleados para el crecimiento de <i>P. rubrum</i> .	30
VI	Especificidad de la isomaltulosa sintasa presente en diferentes organismos.	33
VII	Composición del medio de cultivo para el crecimiento de <i>Protaminobacter rubrum</i> .	41
VIII	Composición del medio de cultivo para la producción de la actividad <i>ims</i> en otros microorganismos.	44
IX	Crecimiento de <i>P. rubrum</i> en diferentes fuentes de carbono y actividad <i>ims</i> obtenida.	62
X	Resumen de la actividad <i>ims</i> obtenida con diferentes estrategias de fermentación.	65
XI	Resumen del estudio cinético de <i>P. rubrum</i> frente a diferentes fuentes de carbono.	67

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	TITULO	PAGINAS
1	Estructuras químicas de la sacarosa, trehalulosa e isomaltulosa.	9
2	Vías metabólicas intracelular y extracelular del metabolismo de glucosa en <i>P. aeruginosa</i> .	16
3	Mecanismos propuestos para la formación de isomaltulosa y trehalulosa a partir de sacarosa	27
4	Mecanismo de reacción y estado de transición propuestos para la reacción catalizada por la isomaltulosa sintasa de <i>P. rubrum</i> .	29
5	Curva estándar de isomaltulosa empleando el método de DNS.	36
6	Curva estándar de proteína según el método de Lowry.	38
7	Curva estándar de peso seco.	40
8	Cinética de crecimiento de <i>P. rubrum</i> en glucosa.	46
9	Cromatografía en capa fina de la fermentación de <i>P. rubrum</i> en glucosa.	46
10	Cinética de crecimiento de <i>P. rubrum</i> en fructosa.	47
11	Cromatografía en capa fina de la fermentación de <i>P. rubrum</i> en fructosa.	48
12	Cinética de crecimiento de <i>P. rubrum</i> en sacarosa.	49
13	Cromatografía en capa fina de la fermentación de <i>P. rubrum</i> en sacarosa.	49
14	Cinética de crecimiento de <i>P. rubrum</i> en isomaltulosa.	50
15	Cromatografía en capa fina de la fermentación de <i>P. rubrum</i> en isomaltulosa.	51
16	Cinética de crecimiento de <i>P. rubrum</i> en maltosa.	53
17	Cromatografía en capa fina de la fermentación de <i>P. rubrum</i> en maltosa.	54
18	Cinética de crecimiento de <i>P. rubrum</i> en glucosa y fructosa al 1%.	56
19	Cromatografía en capa fina de la fermentación de <i>P. rubrum</i> en glucosa y fructosa al 1%.	57
20	Cinética de crecimiento de <i>P. rubrum</i> en glucosa 1% e isomaltulosa 1.9%.	58
21	Cromatograma de la fermentación con glucosa 1% e isomaltulosa 1.9%.	58

22	Cinética de crecimiento de <i>P. rubrum</i> en glucosa 1% y sacarosa 1.9%	60
23	Cromatografía en capa fina de la fermentación de <i>P. rubrum</i> en glucosa 1% y sacarosa 1.9%.	61
24	1ª. Parte de la fermentación: Conversión de sacarosa a isomaltulosa.	64
25	2ª. Parte de la fermentación: Crecimiento de <i>P. rubrum</i> en isomaltulosa.	64
26	Cromatografía en capa fina de las reacciones de la <i>ims</i> frente a diversos sustratos.	69
27	Cromatograma de la reacción utilizando glucosa y fructosa como sustratos, para la síntesis de isomaltulosa.	70

RESUMEN

La isomaltulosa es un isómero funcional de la sacarosa, por lo que posee un comportamiento fisicoquímico muy similar a ésta; quizá por ello el estudio de su potencial aplicación para sintetizar biosurfactantes (Van der Heijden et al., 1997), así como en la industria farmacéutica (como excipiente para tabletas), alimentaria (en la producción de alimentos de humedad intermedia, bebidas carbonatadas y lácteas) y en el área médica (por su carácter no cariogénico, por favorecer el desarrollo de bifidobacterias y como nutriente en mamíferos diabéticos) ha cobrado un gran interés en los últimos años (Lichtenthaler et. al., 1997; Okuda et. al., 1986). La síntesis química de este azúcar resulta demasiado difícil y de costo elevado; es por esto que los desarrollos biotecnológicos cobran importancia en la producción de isomaltulosa de origen microbiano, ya que se puede diseñar un método con posibilidades de fácil operación a nivel industrial. Su producción se ha realizado por fermentación en cultivo sumergido utilizando la enzima isomaltulosa sintasa (5.4.99.11) que es producida, entre otros microorganismos, por *Protaminobacter rubrum* (Fuji et. al., 1985; Tinoco; 1997).

En el presente trabajo se estudió el comportamiento metabólico de *P. rubrum* NRRL B-2348 ante diferentes azúcares, prestando particular atención en la producción de la enzima isomaltulosa sintasa (*ims*) con el objetivo de desarrollar nuevas estrategias de fermentación para mejorar la producción de la enzima. Primeramente se encontró que además de la sacarosa, la fructosa y la isomaltulosa fueron capaces de favorecer la actividad *ims*, en niveles mayores a los obtenidos al emplear sacarosa. Se comprobó también que en presencia de glucosa la actividad es muy baja. Al realizar fermentaciones con mezclas de azúcares fue posible reconocer un patrón típico semejante al de bacterias que utilizan el sistema PTS para el transporte de glucosa, fructosa e isomaltulosa; no así para sacarosa. Finalmente, se diseñó y experimentó una nueva estrategia de fermentación en dos etapas, con la cual fue posible obtener el doble de actividad *ims* utilizando la sacarosa como fuente de carbono, energía e inductor, respecto a los valores obtenidos en una fermentación en lote tradicional, empleando igualmente sacarosa.

I. INTRODUCCIÓN

La **isomaltulosa** (conocida también como palatinosa o lilosa) es una 6- α -D-glucopiranosil-D-fructofuranosa (Collins, 1987; Cheetham, 1987), que se encuentra en pequeñas cantidades en la miel; presenta un comportamiento fisicoquímico muy similar al de la sacarosa, con tan solo un 30% de su poder edulcorante y 60% del poder reductor de la glucosa (Cheetham, 1987; Mc Allister et al., 1990; Cheetham, 1984). Es por lo tanto, una opción de interés en la producción de alimentos de humedad intermedia. Dentro de otras ventajas, destacan: su aplicación ya conocida en alimentos para diabéticos y deportistas, por la lenta liberación de glucosa; su carácter no cariogénico; su mayor resistencia a la hidrólisis ácida y enzimática (invertasa) que la sacarosa; ser un excelente excipiente para tabletas y la capacidad de ser fermentado por las bifidobacterias y no por las enterobacterias, haciendo desfavorable el desarrollo de los microorganismos de la putrefacción que muestran una tendencia a causar diarrea (Cheetham, 1987; Takazoe, 1989; Low et al., 1988).

La síntesis química de este azúcar resulta demasiado difícil y de costo elevado; es por esto que los desarrollos biotecnológicos cobran importancia en la producción de isomaltulosa de origen microbiano, ya que se puede diseñar un método con posibilidades de fácil operación a nivel industrial, que nos proporcione un producto de alta pureza, de bajo costo y con buenos rendimientos. Su producción se ha realizado por fermentación en cultivo sumergido utilizando la enzima isomaltulosa sintasa (5.4.99.11).

La isomaltulosa sintasa (*ims*) es producida, entre otros microorganismos, por *Protaminobacter rubrum* (Fuji et al., 1985; Tinoco, 1997) y es la responsable de la bioconversión de sacarosa en isomaltulosa. Su mecanismo de acción no requiere de iones o cofactores ni de intermediarios de alta energía como UDP-glucosa o polisacáridos (Cheetham, 1984). Además de la isomaltulosa, la enzima forma trehalulosa, fructosa y glucosa libres. Pese a que su mecanismo de reacción es aún incierto, existen algunas hipótesis que describen a la enzima como una α -glucosiltransferasa (Cheetham, 1984; Kakinuma et al., 1994, 1996 y 1998), sin embargo, recientemente fue clasificada dentro del grupo de las isomerasas que llevan a cabo transferencias intramoleculares (5.4.99.11).

Es importante resaltar que la sacarosa es la materia prima para la elaboración de la isomaltulosa. Hoy en día, la industria de la caña de azúcar se ve seriamente afectada por la competencia de otros edulcorantes, tanto calóricos (jarabes fructosados), como los no calóricos (aspartamo, sacarina, acesulfame K, etc.) así como por los precios internacionales. Ante esta situación, es prioritario encontrar vías alternas de valoración de la sacarosa, para países productores de azúcar de caña, como es el caso de México.

Por otro lado, debe mencionarse que en la actualidad no existen estudios acerca del metabolismo de la isomaltulosa en bacterias, únicamente en ratas, perros y humanos (Goda & Hosoya, 1983; Kawai et al., 1986; Paige et al., 1992). Resulta entonces necesario obtener información básica acerca del transporte y metabolismo de este azúcar en microorganismos con el objeto de mejorar las estrategias de fermentación ya existentes.

En el laboratorio de tecnología enzimática del Instituto de Biotecnología de la UNAM, se desarrollan investigaciones con el objeto de encontrar vías alternas para la utilización de la sacarosa mediante conversiones enzimáticas, obteniendo así diferentes gluco y fructo-oligosacáridos, glucósidos, fructósidos e isómeros de la sacarosa como es el caso de la **isomaltulosa**.

El presente trabajo se ubica dentro de una línea general cuyo objetivo final es desarrollar tecnología para la producción de isomaltulosa. Con este fin, es necesario estudiar diversos aspectos que van desde la selección de la cepa, la producción y caracterización de la enzima, la optimización de ésta, hasta el desarrollo del biocatalizador y la optimización del proceso en sí.

El objetivo específico de este proyecto, fue estudiar el comportamiento metabólico de *P. rubrum* NRRL B-2348 con diferentes azúcares, prestando particular atención en la producción de la enzima *ims*, con el objetivo de desarrollar nuevas estrategias de fermentación para mejorar la producción de esta enzima, permitiéndonos diseñar un mejor catalizador para la producción de isomaltulosa.

II. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL:

- ◆ Desarrollar una nueva estrategia de fermentación para mejorar la actividad de síntesis de isomaltulosa en la cepa *Protaminobacter rubrum* NRRL B-2348.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- ◆ Estudiar el efecto de diferentes fuentes de carbono en la producción de la enzima.
- ◆ Relacionar la producción de la enzima con las cinéticas de consumo de las diferentes fuentes de carbono utilizadas.
- ◆ Proponer mecanismos de asimilación de las diferentes fuentes de carbono en base a las cinéticas de crecimiento.
- ◆ A partir de estos resultados, proponer un sistema de producción de alto rendimiento para la *ims*.

III. ANTECEDENTES

3.1. La sacarosa como materia prima.

La sacarosa, es sin lugar a dudas el edulcorante de mayor consumo mundial. Este producto proviene de la caña de azúcar o de la remolacha y representa una de las más importantes fuentes calóricas. Por diversas causas, dentro de las que destacan la sobreproducción agrícola y la producción biotecnológica de productos alternativos como lo son los jarabes con alto contenido de fructosa (JACF) y nuevos edulcorantes sintéticos no calóricos, el precio internacional de la sacarosa ha ido disminuyendo.

Otro factor relevante es el evidente estancamiento que ha sufrido la demanda, debido a que desde hace 2 décadas, existe una tendencia mundial a disminuir el consumo de edulcorantes calóricos en favor de los sintéticos no calóricos (Jacobsson et al., 1986; Tsuyuki et al., 1992). Dentro de los edulcorantes calóricos, la sacarosa ha venido perdiendo mercado ante el avance de los jarabes fructosados, al grado de haber alcanzado una producción mundial de casi 8 millones de toneladas, sustituyendo totalmente a la sacarosa en la elaboración de bebidas carbonatadas en los Estados Unidos de Norteamérica (USDA).

En relación con los edulcorantes no calóricos, cuyo consumo se ha incrementado considerablemente en los últimos años, podemos afirmar que el aumento en la demanda responde a la necesidad de disminuir el consumo de edulcorantes calóricos, sacarosa principalmente, por el uso de dietas controladas o bien por programas de prevención de caries dental, de diversas enfermedades como la diabetes, demanda en productos farmacéuticos (como excipiente en tabletas), etcétera. La sacarina era hasta finales de los años setenta, el edulcorante más común, producido por síntesis química, y con algunas excepciones (como los ciclamatos) representaba la única opción no calórica (Barry, 1987). Sin embargo, a partir de finales de la década de los ochenta, ésta fue desplazada casi totalmente por el aspartame, otro producto de desarrollo de la biotecnología. Podemos entonces concluir que independientemente de los problemas financieros y de endeudamiento, la industria de la caña de azúcar se encuentra seriamente deteriorada y con riesgos de quiebra. Todo esto nos lleva a la urgente necesidad de encontrar alternativas agroindustriales para la revalorización de la sacarosa.

En la **Tabla I** se presenta un resumen de diversos edulcorantes y su poder endulzante relativo a la sacarosa; al analizar la tabla, se puede apreciar que la influencia de los desarrollos biotecnológicos en este sector ha sido considerable.

Tabla I. Edulcorantes alternativos a la sacarosa.

PRODUCTO	PODER EDULCORANTE (Sacarosa=1)	ORIGEN (*)
Edulcorantes calóricos		
Azúcar invertido	1	Q, E
Fructosa	1.4	E
Jarabes Fructosados (55%)	1	E
Jarabes Fructosados (90%)	1.5	E
Jarabes Maltosados (45-60%)	0.4	E
Jarabes Maltosados (70-85%)	0.6	E
Sorbitol	0.6	Q
Xilitol	1	Q, E
Manitol	0.5	Q
Isomaltulosa	0.3	E
Palatinita	0.5	EQ
Neozúcares	varios	E
Edulcorantes no calóricos		
Aspartame	180	QFE, FE
Alitamo	2160	QE, E
Acesulfame-K	200	Q
Sacarina	300	Q
Sucralosa	600	QE
Ciclamatos	30	Q
Dihidrochalconas	1800	Q
Monelina (proteína)	2500	N
Taumatina (proteína)	3000	N,F
Esteviósido	300	N
Glicirrizina	50	N
Dulcina	200	Q
Miraculina (proteína)	1500	N
Hernandulcina	1000	N

N=Natural; Q=Sintético vía química; E=Enzimático; F=Fermentativo o combinaciones de estos.

Tomada de López-Munguía, 1993.

3.2. La isomaltulosa.

3.2.1. Procesos de producción.

Históricamente, los primeros reportes que se tienen de la identificación de la isomaltulosa de origen microbiano es de Stodola et al. (1952), y Sharpe et al. (1954) quienes describen que ese compuesto es un subproducto de la formación de leucrosa (5-O- α -D-glucopiranosil-D-fructopiranos) y dextrana con *Leuconostoc mesenteroides*; sin embargo, la formación de azúcares reductores por estos microorganismos y por *Streptococcus bovis* a partir de sacarosa, fue mencionada con anterioridad por Hehre (1951). Más tarde, Bailey & Bourne (1959) notaron que un disacárido reductor similar a la isomaltulosa era producido por *S. bovis*. Stodola et al. (1956) y Sharpe et al. (1960), confirmaron la formación de isomaltulosa por enzimas derivadas de *L. mesenteroides*. Posteriormente, se encontró que una α -glucosidasa de *Streptococcus italicus* formaba isomaltulosa como producto de transglucosilación (Halvorsen, 1966). En datos más recientes, Fuji et al. (1983), estudió la formación de oligosacáridos por la acción de *Serratia plymuthica* en sacarosa y encontraron que la isomaltulosa era el producto mayoritario, acompañada de otros azúcares.

Se aislaron microorganismos de la remolacha proveniente de refinerías, las cuales se crecían inicialmente en un medio con 5% de sacarosa y otros nutrientes; posteriormente, las células se incubaban con un jarabe de sacarosa 20% hasta lograr su conversión total en isomaltulosa (Cheetham, 1987).

La síntesis química de la isomaltulosa resulta demasiado difícil y de costo elevado. Es por esto, que los desarrollos biotecnológicos cobran importancia en la producción de isomaltulosa de origen microbiano, ya que constituyen una alternativa viable, de fácil operación a nivel industrial, que nos proporcione un producto de alta pureza, de bajo costo y con buenos rendimientos.

En la industria, la isomaltulosa se obtiene vía enzimática empleando la enzima isomaltulosa sintasa y sacarosa como sustrato (Cheetham, 1987; Nakajima, 1984); si la isomaltulosa es sometida a una hidrogenación alcalina con catalizadores Nickel/Raney, permite producir Palatinita[®](Irwin, 1990).

Igualmente, la producción de isomaltulosa se ha realizado por fermentación o empleando células inmovilizadas utilizando: *S. plymuthica* (Mc Allister et al., 1990), *P. rubrum* (Schiwek et al., 1974; Nakajima, 1984 y Tinoco, 1997) y *Erwinia rhapsodici* (Cheetham et al., 1982 y 1984). Adicionalmente, se reporta que se han encontrado pequeñas cantidades de isomaltulosa en fermentaciones realizadas en medio sólido con la enzima de *E. rhapsodici* (Cheetham, 1987).

3.2.2. Características fisicoquímicas.

La isomaltulosa es un disacárido que se encuentra en pequeñas cantidades en la miel (1%) y en el jugo de caña (Low & Sporns, 1988 y Takazoe, 1985a). Uno de los primeros reportes fue en el proceso de manufactura de la remolacha en 1957 por Weidenhagen & Lorenz en la fábrica de una ciudad llamada Palatino, en Alemania, de ahí su nombre trivial de **Palatinosa®** (Takazoe, 1989). Es conocida también como lillosa; de acuerdo con la nomenclatura química convencional es una 6- α -D-glucopiranosil-D-fructofuranosa (Cheetham et al., 1982, Park et al., 1992 y Fuji, 1983). En la **Figura 1** se presenta un esquema con su estructura química, así como las de otros azúcares asociados.

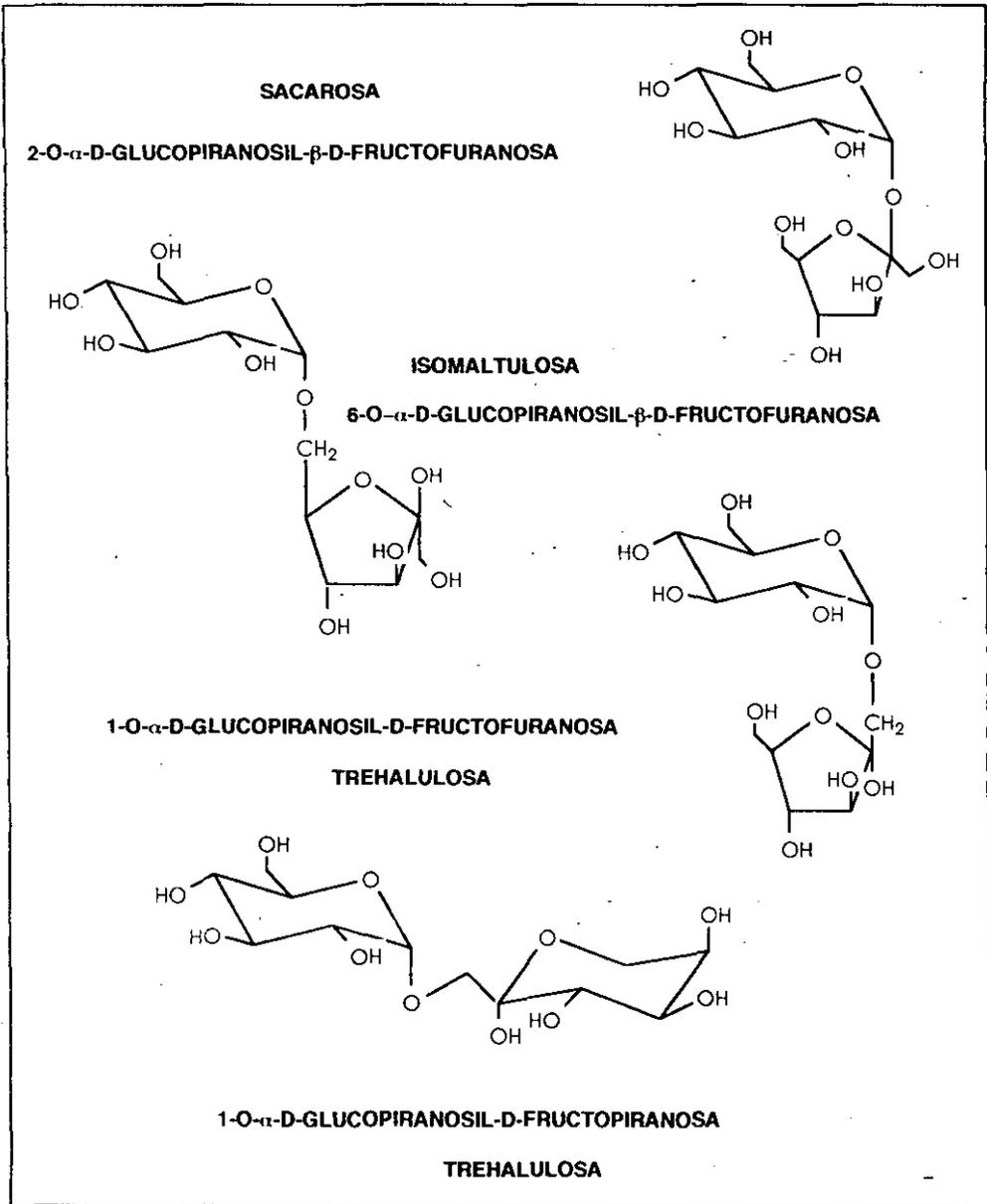


FIGURA 1. Estructuras químicas de la sacarosa, trehalulosa e isomaltulosa.

Ullman, 1985 y Shallenberger, 1982.

La isomaltulosa es un isómero funcional de la sacarosa (Mc Allister et al., 1990 y Cheetham, 1984), por lo que presenta un comportamiento fisicoquímico muy similar a ésta: posee tan solo un 30% de su poder edulcorante (Cheetham, 1987 y Mc Allister et al., 1990); es mucho más resistente a la hidrólisis ácida que la sacarosa, en un rango de pH normal de un alimento (2.5-6), por lo que al incorporarla en bebidas carbonatadas o alimentos acidificados con ácidos orgánicos o vitamina C, la proporción de azúcar invertido que se obtiene es considerablemente menor y por lo tanto, son más estables que aquellos que contienen sacarosa. Sin embargo es menos estable a la temperatura que la sacarosa (Takazoe, 1989); igualmente, es más resistente a la hidrólisis enzimática (invertasa). Es un azúcar con el 60% del poder reductor de la glucosa, por lo tanto participa en reacciones de oscurecimiento en alimentos (Cheetham, 1984). Por sí sola, la isomaltulosa es menos higroscópica que la sacarosa y fructosa. En la **Tabla II**, se presentan las propiedades físicas de la isomaltulosa.

Tabla II. Propiedades físicas de la isomaltulosa.

Peso molecular (monohidratada)	360 g/mol
Punto de fusión	118 a 122 °C
Densidad absoluta	1.45 g/mL
Solubilidad	70 g /100mL a 30°C
Rotación específica	$[\alpha]_D^{20}$ es de 97.2°.
Tipo de fluido	Newtoniano
Viscosidad de una solución	Ligeramente menor que una de sacarosa a la misma concentración
Cristales de la isomaltulosa monohidratada	Blancos y rómbicos

Tomada de Cheetham, 1987 y Takazoe, 1989.

La estructura cristalina de la isomaltulosa está determinada por un puente de hidrógeno intramolecular entre los átomos de carbono 2 y 2' y varios puentes de hidrógeno intermoleculares. Los espectros de resonancia magnética nuclear, demuestran que existe una relación 1:4 de isómeros $\alpha:\beta$ a 34 °C, lo que es muy similar a los valores reportados para la fructosa (Cheetham, 1987; Fuji, 1983).

3.2.3. Microorganismos productores de isomaltulosa.

De acuerdo con Mc Allister et al., 1990, existen dos tipos de microorganismos productores de isomaltulosa:

1. Los que producen isomaltulosa como subproducto en la formación de dextrana, por ejemplo: la dextransacarasa de *L. mesenteroides*, y;
2. Aquellos que producen isomaltulosa como producto mayoritario a partir de sacarosa.

Cheetham (1987), reporta que tanto *S. plymuthica* como *P. rubrum* poseen actividades iniciales de producción de *ims* más elevadas que *E. rhapsontici*; así mismo, un estudio de estabilidad bajo diferentes condiciones en el almacenamiento de dichos microorganismos, refleja que *S. plymuthica* posee una mayor viabilidad que *P. rubrum* y *E. rhapsontici*. Sin embargo, Cheetham seleccionó a *E. rhapsontici* como cepa productora debido a que presenta una mayor estabilidad operacional al emplear células inmovilizadas en alginato.

Por otro lado, se sabe que *E. rhapsontici* es una bacteria que causa podredumbre en el ruibarbo (Cheetham et al., 1982); que *S. plymuthica* es patógena, incluso para el humano (Bergey, 1988) y que *P. rubrum* no es patógeno (Irwin, 1990).

En la **Tabla III** se presenta una lista de microorganismos productores de isomaltulosa, así como las proporciones de isomaltulosa y trehalulosa que sintetizan.

Tabla III. Microorganismos productores de isomaltulosa.

Microorganismo	Isomaltulosa	Trehalulosa	Referencia
<i>E. rhapsodica</i> NCPPB 1578	40%	60%	Véronese et al., 1999.
<i>E. rhapsodica</i> NCPPB 1578	85%	SP	Cheetham 1982, 1984, 1987.
<i>E. rhapsodica</i> ATCC 29284	PP	SP	Cheetham et al. 1985
<i>E. carotovora</i>	PP	SP	Cheetham et al. 1985
<i>S. plymuthica</i> ATCC 15928	87%	SP	Mc Allister et al., 1990, Fuji et al., 1983 y Cheetham, 1984
<i>P. rubrum</i> . NCIB2878.	85%	15%	Cheetham, 1984 y Takazoe, 1989.
<i>P. rubrum</i> . NRRL B-2348.	90%	<10%	Tinoco, 1997.
<i>S. marcescens</i> NCIB 8285	P	NR	Cheetham et al. 1985
<i>L. mesenteroides</i> NRRL B-512F	SP	NR	Mc Allister et al., 1990 y Bourne et al., 1961
<i>Str. bovis</i> ATCC 33317	<1%	NR	Bourne et al., 1961
<i>S. bovis</i>	P	NR	Cheetham, 1984 y Bailey & Bourne, 1959
<i>S. italicus</i>	P	NR	Cheetham, 1984 y Halvorsen, 1966
<i>Klebsiella</i> sp. Aislada de mango	86%	SP	Takazoe, 1989
<i>Klebsiella planticola</i> MX-10	65%	30%	Tsuyuki et al., 1992
<i>Ps. mesoacidophila</i> MX-45	9%	91%	Nagai, 1994
<i>Thermus aquaticus</i> ATTC 33923	<4%	81%	Nishimoto et al., 1997
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	SP	PP	Nagai, 1994

P=Produce; PP=Producto principal; SP=Produce como subproducto; NR=No se reporta si produce o no.

a) *Protaminobacter rubrum*.

P. rubrum NRRL B-2348 es una bacteria gram negativa en forma de bacilos muy cortos que llegan a parecer cocos. Se asocian formando duplas y algunas veces se encuentran aislados. Sus colonias son blancas aperladas circulares, convexas, de bordes redondos, con la edad y en presencia de oxígeno se tornan de color rojo-rosado (Tinoco, 1997).

El género *Protaminobacter* no se encuentra clasificado actualmente como tal (Gherna et al., 1999; Bergey et al., 1998). Seguramente, esto se debe a que desde los años sesenta diversos géneros han sido reclasificados en un sin número de ocasiones en nuevos grupos, que incluyen: *Bacillus*.

Pseudomonas, *Protaminobacter*, *Vibrio*, *Mycoplana*, *Flavobacterium*, *Corynebacterium*, *Chromobacterium* y *Methylobacterium* (Green & Bousfield, 1982). De acuerdo a la opinión de los expertos en el área, algunas cepas de *Protaminobacter ruber*, *P. ruber sp. machidanus* y *P. sp* han sido integradas al género *Methylobacterium* (Whittenbury et al., 1970; Green & Bousfield, 1982).

El género *Methylobacterium* está compuesto de una gran variedad de bacterias metilotróficas facultativas y de pigmento rosado (PPFM) que son capaces de crecer en compuestos unicarbonados como formiato, formaldehído y metanol como única fuente de carbono y energía. La mayoría pueden crecer en aminas metiladas. Sólo se ha reportado una cepa capaz de crecer en metano (Balows et al., 1991). A pesar de que la mayoría de las cepas del género son gram negativas, algunas se tiñen ocasionalmente de gram variable. Este hecho aunado a sus características morfológicas, ha ocasionado una gran confusión alrededor de su clasificación taxonómica.

Por ejemplo, *Bacillus extorquens* que fue aislado por Bassalik en 1913, se asignó al género *Vibrio* como *V. extorquens* por Bhat y Barker en 1948. Krasil'nikov (1959) y Bassalic (1960) transfirieron subsecuentemente esta cepa a *Pseudomonas* y *Flavobacterium*; sin embargo, en la clasificación del Bergey's Manual apareció como *Pseudomonas extorquens* (Bergey et al., 1988).

En un estudio acerca de bacterias que utilizan aminas, Dooren de Jong (1927) describe una cepa de *P. rubrum* que posteriormente fue estudiada junto con otros organismos aislados del suelo y se reagruparon dentro del género *Mycoplana* como *M. rubra* (De Vires & Derx, 1953). En 1961 sufrió una nueva reclasificación y quedó dentro del género *Vibrio* como *Vibrio extorquens* (Stocks and Mc Cleskey, 1964). Ya en la década de los setentas, Kouno & Ozaki (1975) y Austin y cols. (1979) aislaron y estudiaron diferentes PPFM's y concluyeron que era necesario hacer mayor investigación al respecto para realizar una adecuada clasificación.

El primer reporte de una PPFM capaz de utilizar metano, fue aislada por Patt y col. en 1976, quienes crearon una nueva especie para agrupar su cepa y la denominaron *Methylobacterium organophilum*. En un estudio más detallado (Green & Bousfield, 1982) se encontró que esa y otras bacterias eran muy parecidas a las PPFM, por lo que se sugirió que fuesen incluidas en el género *Methylobacterium*. Sin embargo, el género *Methylobacterium* excluye a los organismos que no utilizan metano, por lo que en 1983 surgió una corrección a la clasificación para incluir a las PPFM

restantes que no utilizan metano debido a que su similitud con el género era de 70% o más (Green & Bousfield, 1983).

Como resultado de esta modificación, se añadieron también otras cepas encontradas anteriormente y clasificadas como *Pseudomonas*:

- *Ps. rhodos* reclasificada como *M. rhodinum* (Heumann, 1962).
- *Ps. mesophilica* reclasificada como *M. mesophilicum* (Austin & Goodfellow, 1979).
- *Ps. radiora* reclasificada como *M. radiotolerans* (Ito & Iizuka, 1971).

Con los avances científicos surgió la posibilidad de estudiar la homología del DNA, hacer comparaciones electroforéticas de las proteínas de los microorganismos y estudiar la composición de los ácidos grasos (Urakami & Komogata, 1979, 1981). Como resultado, nuevas especies fueron anexadas al género *Methylobacterium* como: *M. rhodesianum*, *zatmanii*, *fujisawaense* y las bacterias pertenecientes al género *Protomonas* (Urakami & Komogata, 1984; Green et al., 1988; Bousfield & Green, 1985).

En la actualidad, el género *Methylobacterium* tiene 8 especies reconocidas, siendo la cepa tipo *Methylobacterium extorquens*. Las cepas reportadas como *Protaminobacter* en los años sesenta y anteriores, corresponden a los que hoy se denomina: *M. extorquens*, *M. rhodesianum* y *M. organophilum* (Balows et al., 1991). Sin embargo, en la literatura no se precisa si *P. rubrum* corresponde a alguna de estas cepas, por lo que para fines del presente trabajo se denominará *P. rubrum* y no *Methylobacterium*.

3.2.4. Su función adaptativa en microorganismos.

El papel que la isomaltulosa tiene en algunas bacterias como *P. rubrum* y su función adaptativa es aún incierta, sin embargo, se han generado algunas hipótesis al respecto en base a la experiencia observada en otros organismos.

a) Fuente de carbono y energía secuestradas.

Whiting y cols. (1976a) presentan la hipótesis de que la evolución ha permitido que tanto *Pseudomonas aeruginosa* como *P. fluorescens* en su hábitat natural puedan secuestrar la glucosa convirtiéndola en gluconato y 2-oxogluconato, compuestos que no son fácilmente asimilados por otros microorganismos que sí podrían competir por la glucosa. En este mismo sentido, Cheetham et al. (1982) propone que en *E. rhapontici* podría suceder lo mismo: secuestra la sacarosa en forma de isomaltulosa para posteriormente emplearla como fuente de carbono y energía, liberando cualquier competencia por el sustrato original proveniente de otro microorganismo o de la propia planta a la cual parasita.

Una situación semejante aunque más compleja es el papel que juega la 3-cetosacarosa en el metabolismo de *Agrobacterium tumefaciens*. Hayano y Fukui (1967) fueron los primeros en explicar su carácter como intermediarios en el metabolismo de sacarosa. Ellos explican que la deshidrogenasa que convierte sacarosa en 3-cetosacarosa es parte del sistema de transferencia de electrones relacionado con las reacciones de rendimiento energético, ya que transfiere los electrones de la sacarosa al citocromo C₅₄₁, por lo que la 3-cetosacarosa se convierte en un intermediario más del metabolismo general y no en un metabolito con una acción específica.

b) Metabolismo alterno en limitación de nutrientes.

El metabolismo de *P. aeruginosa* es complejo, involucra 2 rutas metabólicas: una oxidativa y otra fosforilativa. Las enzimas de la vía oxidativa se encuentran en la membrana citoplásmica viendo hacia el espacio periplásmico. Los productos de su actividad (gluconato, glucosa y 2-oxogluconato) son transportados al interior mediante canales específicos. La vía fosforilativa ocurre intracelularmente y converge en el interior de la célula con la vía oxidativa en la formación del gluconato 6 fosfato (Whiting et al., 1976b). La **Figura 2** explica detalladamente el metabolismo de esta bacteria. Whiting y cols. (1976b) trabajaron en un quimiostato con *P. aeruginosa* y comprobaron que la ruta habitual es la oxidativa, sin embargo, bajo limitaciones de glucosa, el metabolismo es modificado a la ruta fosforilativa por lo que es evidente que la conversión extracelular de glucosa a gluconato y 2-oxogluconato con el subsecuente transporte, le permite a *P.*

aeruginosa soportar cualquier limitación impuesta por la velocidad de operación de un solo sistema de transporte, por la subsecuente fosforilación o hasta en su propio hábitat natural, ya que le permite a la bacteria convertir la glucosa rápidamente en otros compuestos que son menos disponibles a otros microorganismos y que podrían competir efectivamente por la glucosa.

Tomando como referencia lo anterior, se podría pensar en un sistema semejante para *P. rubrum* y las bacterias que producen isomaltulosa, ya que les permite conservar una fuente de carbono y energía alterna a la que encuentran en su hábitat natural, de manera que la transporten fácilmente a su interior cuando se encuentren en situaciones como la limitación de nutrientes. Sin embargo existirían algunas diferencias puntuales debido a que la *ims* se localiza, en algunos casos, en el espacio periplásmico (como *E. rhapontici*, Cheetham, 1984) y en otros, en el interior de la célula (como *S. plymuthica* y *P. rubrum*, Mc. Allister et al., 1990).

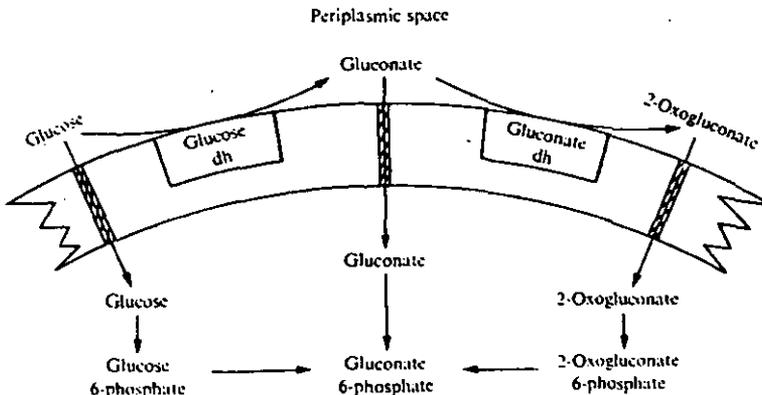


Figura 2. Vías metabólicas intracelular y extracelular del metabolismo de glucosa en *P. aeruginosa*. dh: Deshidrogenasa.

c) Osmoprotector.

El ajuste del turgor en bacterias expuestas a ambientes hiperosmóticos se atribuye a la acumulación de grandes cantidades de solutos orgánicos y de iones potasio. Muchos osmolitos orgánicos que se encuentran en el medio ambiente funcionan también como osmoprotectores en bacterias. Existen osmoprotectores endógenos y exógenos: los primeros, contribuyen directamente a reestablecer el turgor de la célula mediante su acumulación en el citoplasma; son inducidos o activados en condiciones hiperosmóticas. Los osmoprotectores exógenos en algunos casos contribuyen de forma indirecta en el turgor celular y son utilizados como fuente de carbono y energía; se denominan exógenos porque no se acumulan en el interior de la célula. *Sinorhizobium meliloti* utiliza la sacarosa como un osmoprotector muy poderoso y también como fuente de carbono y energía (Gouffi et al., 1999).

Debido a que la sacarosa no es un osmoprotector convencional para *S. meliloti*, Gouffi y cols. (1999) decidieron explorar qué otros azúcares y compuestos estructuralmente relacionados con la sacarosa podían ser utilizados como osmoprotectores exógenos por *S. meliloti* y algunas bacterias semejantes. Encontraron que la isomaltulosa al igual que la sacarosa protege a la célula dentro de ambientes hiperosmóticos y le permite crecer con un tiempo de duplicación igual. Evidentemente la isomaltulosa es fácilmente catabolizada por esta bacteria.

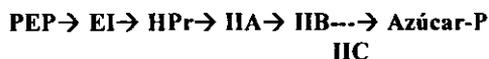
De lo anterior, podemos entonces suponer que las bacterias que producen isomaltulosa, tendrían una triple ventaja al contar este disacárido:

- Secuestrar una fuente de carbono y energía “convencional” como lo sería la sacarosa y crear sus propias reservas.
- Utilizar la isomaltulosa como fuente de carbono y energía en limitación de nutrientes.
- Emplearla como un osmoprotector en su hábitat natural.

d) Transporte de azúcares.

El transporte de azúcares y su fosforilación son factores claves para comprender el crecimiento de una bacteria; sin embargo, no existe información en la literatura acerca del transporte de isomaltulosa y/o su metabolismo en microorganismos. Es posible dadas las características de la isomaltulosa y las de los microorganismos que la producen que estemos hablando del sistema PTS (PhosphoTransferase System) (Lengeler et al., 1982).

El sistema PTS en bacterias es un complejo enzimático que transporta los azúcares a través de la membrana celular, los fosforila y actúa como un sistema quimiorreceptor permitiendo a la bacteria elevar la concentración interna de azúcares (Saier et al., 1995). El sistema PTS consiste generalmente en dos proteínas acopladoras de energía: la enzima uno (EI), la "Heat-stable Protein" (HPr), así como una colección de enzimas específicas (complejo de la enzima 2) en las que se incluye un sistema de transporte o permeasa. Cada permeasa contiene al menos tres elementos que pueden ser proteínas o dominios proteicos llamados IIA, IIB y IIC que conforman una cadena de fosforilación que llega hasta el azúcar, permitiendo su transporte al interior de la célula.



EI, HPr, IIA y IIB son las proteínas transportadoras del grupo fosfato proveniente del fosfoenolpiruvato (PEP) y IIC es la proteína embebida en la membrana (permeasa) que cataliza el transporte del azúcar a través de la membrana, así como la transferencia del grupo fosfato de IIB al azúcar entrante (Lengeler et al., 1982; Lin, 1996).

En algunos organismos y sistemas (como *E. coli* para el transporte de manitol) estas proteínas están comprendidas en un solo polipéptido y en otros (*E. coli* para glucosa) son polipéptidos separados (Saier et al., 1995). Estos arreglos son de vital importancia, ya que el sistema PTS controla numerosos procesos fisiológicos como: transporte, metabolismo y almacenamiento de fuente de carbono, metabolismo oxidativo sobre fermentativo y coordinación de metabolismo de nitrógeno con metabolismo de carbono (Romano, 1986).

En bacterias gram negativas, el sistema PTS controla el metabolismo de carbono (ya que es el sistema predominante de transporte de azúcares) regulando a otras permeasas. La regulación unidireccional, le permite a la bacteria utilizar preferencialmente sustratos PTS que sustratos no PTS (Saier et al., 1995). Es importante enfatizar que pese a que un microorganismo posea un sistema general de transporte PTS, no todos los azúcares los interna a la célula así, precisamente para jerarquizar su transporte (Romano, 1986).

Adicionalmente, PTS regula indirectamente la expresión genética mediante la regulación de la actividad de la adenilato ciclasa. La concentración citoplásmica de cAMP, así como el nivel de la proteína receptora de cAMP (CRP) modulan la expresión de cientos de operones del catabolismo de carbono (Saier et al., 1995).

Concretamente, podemos citar el ejemplo de *Corynebacterium glutamicum* que utiliza sacarosa para crecer y la transporta utilizando la vía de PTS. Durante su crecimiento se inducen actividades PTS para fructosa, sacarosa y manosa de tal forma que la bacteria es capaz de asimilar estos azúcares como fuente de carbono y energía de acuerdo a sus necesidades y/o las condiciones del ambiente que lo rodea (Domínguez y Lindley, 1996).

Recientemente se caracterizó el gene AGT1 que codifica para la proteína Agt1p, que es un transportador de α -glucósidos en *Saccharomyces*, es altamente hidrofóbica y al parecer se localiza en la membrana celular (Han et al., 1995). Posee un 57% de similitud con la proteína Mal61p y también es miembro de una superfamilia de doce diferentes transportadores de azúcares. A diferencia de Mal61p, Agt1p transporta además de maltosa y turanosa, otros sacáridos semejantes, tales como: isomaltulosa, α -metilglucósido, maltotriosa, isomaltulosa, trehalosa y melezitosa.

3.2.5. Aplicaciones potenciales.

Recientemente, la isomaltulosa y su derivado hidrogenado, la Palatinita, han atraído la atención de los investigadores gracias a su enorme potencial de aplicación industrial tanto como sustituto de la sacarosa en un gran número de alimentos (Takazoe, 1985b) o bien como materia prima para la producción de químicos especiales (Irwing, 1990), surfactantes y/o polímeros (Lichtenthaler, 1991, 1996 y 1997; Bucke, 1996).

a) Como sustituto de la sacarosa.

Es sabido que la caries dental es uno de los problemas de salud pública más importantes a combatir en la actualidad. A este respecto, innumerables investigaciones se han abocado al estudio de la isomaltulosa como un sustituto de la sacarosa por su escasa cariogenicidad:

- Se ha comprobado que la microflora oral (principalmente *Streptococcus bovis* y *mutans*) producen pequeñísimas cantidades de ácidos y glucanos insolubles a partir de isomaltulosa, el 5% respecto a lo producido con sacarosa (Birkhed et al., 1985)
- También se ha visto que la síntesis de glucano insoluble se inhibe cuando se emplean mezclas de sacarosa e isomaltulosa. Al adicionar 4% de isomaltulosa, la síntesis del polímero es de 5% respecto a lo obtenido utilizando únicamente sacarosa. La velocidad de inhibición es proporcional a la concentración de isomaltulosa (Takazoe, 1982).
- Los estudios realizados en ratas, infectadas con *S. mutans*, revelan que la isomaltulosa presenta un efecto inhibitorio en la formación de placa y en la adaptación de la cepa a este sustrato (Ooshima, 1983).
- Finalmente, en humanos se han practicado enjuagues bucales con soluciones de isomaltulosa, glucosa, trehalulosa y sacarosa. De ahí se desprende que el pH de la placa dental baja hasta 4.1 con glucosa y/o sacarosa; sin embargo, al utilizar isomaltulosa y/o trehalulosa, el pH llega a 6.8. Adicionalmente, se reporta que la microflora oral se adapta ligeramente a estos sustratos y llega a producir ácido no mayor a un 13.5% de lo observado inicialmente (Topitsoglou et al., 1984).

b) Metabolismo de la isomaltulosa en ratas y humanos.

La mayoría de las bacterias entéricas pueden metabolizar muchos azúcares, la isomaltulosa únicamente puede ser utilizada por las bifidobacterias, por lo que favorece su crecimiento y disminuye el desarrollo de microorganismos con tendencia a causar diarrea. Por esta razón, se ha probado en alimentos, bebidas, bebidas fermentadas y fórmulas de medicamentos, especialmente en aquellos que contienen productos lácteos, manteniéndose el perfil de dulzor y sabor. Además, es un excelente excipiente en tabletas (Cheetham, 1987).

La isomaltulosa es metabolizada en forma muy similar a la sacarosa (Welsh et al., 1966; Macdonald & Daniel, 1983). Se sabe que es hidrolizada a glucosa y fructosa por la acción del complejo sacarasa-isomaltasa que también hidroliza maltosa y que se encuentra en las microvellosidades del intestino delgado (Dalqvist et al., 1963; Galand, 1990 y Heymann et al., 1995). Posee el mismo valor calórico que la sacarosa, pero a diferencia de ésta, la velocidad de liberación de monosacáridos al torrente sanguíneo es menor: 1/5 respecto a la de sacarosa (Kawai, 1989); esto provoca que los cambios de glucosa en sangre y el requerimiento de insulina sean menores que al metabolizar otros azúcares simples (Kawai, 1985; Tsuji et al., 1986). Además, su absorción es más lenta que la de sacarosa, por lo que la posibilidad de aplicar el uso de la isomaltulosa como nutriente parenteral y en la producción de alimentos y bebidas para diabéticos y deportistas resulta sumamente interesante (Takazoe, 1989).

Otros estudios han demostrado que la isomaltulosa no produce efectos de mutagenicidad o toxicidad aguda o crónica (Takazoe, 1989).

3.3. La enzima isomaltulosa sintasa.

En los últimos años, las enzimas han adquirido gran importancia en la industria de los carbohidratos, al encontrar infinidad de aplicaciones en la producción de azúcares y endulzantes. Indudablemente, el avance más significativo ha sido la producción de jarabes de maíz de alta fructosa empleando una enzima inmovilizada: la glucosa-isomerasa. Además, existen muchos otros ejemplos de aplicación de enzimas a nivel industrial; tal es el caso de la producción de jarabes maltosados, aspartame y ciclodextrinas (Cheetham, 1987). Dentro de estos desarrollos biotecnológicos, surgió la alternativa de producir el disacárido isomaltulosa, empleando la enzima isomaltulosa sintasa (Mc Allister et al., 1990; Cheetham 1984; Nakajima, 1984 y Huang et al., 1998).

3.3.1. Características generales.

La enzima responsable de la bioconversión de sacarosa en isomaltulosa se localiza en el espacio periplásmico de algunas bacterias como *E. rhapsodic* (Cheetham, 1984 y 1985) o intracelularmente como en el caso de *S. plymuthica* y *P. rubrum* (McAllister et al., 1990). Es una enzima que no requiere de cofactores o iones en el mecanismo de acción ni tampoco se ha observado que requiera de intermediarios de alta energía como UDP-glucosa o polisacáridos (Cheetham, 1984, 1987; Park et al., 1992 y Takazoe, 1989).

La enzima forma simultáneamente isomaltulosa y trehalulosa (1- α -D-glucopiranosil- α -D-fructopiranosido). La trehalulosa es un disacárido que se encuentra de forma natural en la miel (Nakajima et al., 1990), no cariogénico (Ooshima et al., 1991) y poco dulce, cuya solubilidad es mayor que la isomaltulosa y es hidrolizada en la misma región del complejo sacarasa-isomaltasa del intestino delgado que la isomaltulosa y la palatinita (Nilsson y Jägerstad, 1987 y Yamada et al., 1985). La estructura química de la trehalulosa, se presenta en la **Figura 1**.

La isomaltulosa sintasa no es una enzima común, ya que la reacción que lleva a cabo semeja más una catálisis química que una biocatálisis. La enzima produce simultáneamente isomaltulosa como producto principal y trehalulosa como el producto termodinámicamente mas estable, mediante la hidrólisis de la sacarosa, seguida de la reacción de la glucosa con los grupos hidroxilos de los carbonos 6 y 1 de la fructofuranosa (Fuji et al., 1985 y Cheetham, 1984).

Una característica sorprendente es que la formación de ambos disacáridos a partir de sacarosa se da de manera simultánea y no consecutiva. La formación simultánea es una propiedad intrínseca de la enzima, ya que la relación de isomaltulosa y trehalulosa producidas es constante desde el principio de la reacción y bajo diferentes condiciones, mientras que la reacción consecutiva estaría indicada por una relación de concentraciones diferentes a lo largo de la reacción (Cheetham, 1984).

Es una enzima inducible por sacarosa en condiciones aeróbicas, tiene una alta actividad en ambientes con bajo Aw, lo que permite emplearla exitosamente en procesos a gran escala (Cheetham et al., 1985; Huang et al., 1998 y Nakajima, 1988).

La enzima se ha denominado **isomaltulosa sintasa** y se ha incluido recientemente dentro del grupo que comprende isomerasas que llevan a cabo transferencias intramoleculares de grupos diferentes a acilos, aminos o fosforilos bajo la clave **E.C. 5.4.99.11** (Dixon & Webb, 1999).

En la **Tabla IV** se concentran las principales características para la isomaltulosa sintasa de diferentes microorganismos reportados en la literatura.

Tabla IV. Resumen de las características generales de las isomaltulosa sintasa de los principales microorganismos productores de isomaltulosa.

Microorganismo	Forma estudiada	pH óptimo	T óptima °C	Constantes cinéticas	Características
<i>E. rhapsodici</i> (1)	CIA			Km para sacarosa= 280 mM	ΔG reacción= -11.8 KJ/mol ΔG hidrólisis sac= -28 KJ/mol Ea= 17 KJ/mol ΔH de reacción= 14.5 KJ/mol
<i>E. rhapsodici</i> (2)	CIA	7	30	Km para sacarosa= 350 mM	
<i>S. plymuthica</i> (3)	EP	6	30	Km para sacarosa= 65.3 mM	A.E=1,285 U/mg P P. isoelectrico = 9; PM= 79,500 Da
<i>S. plymuthica</i> (4)	EIA				τ a 25°C en reacciones en lote= 23 días
<i>Protaminobacter rubrum</i> (3, 4, 5, 8 y 9)	EIA	5.5	25	Km para sacarosa= 140 mM Ki por producto= 310 mM	τ a 25°C en reacciones en lote= 73 días P. isoelectrico = 9.9; PM= 62,000Da
<i>Protaminobacter rubrum</i> (10)	E	6	30	Km para sacarosa = 21 mM Ki por sustrato = 1.18 M	Ea 40 = KJ/mol τ a 30°C = 38 días
<i>Protaminobacter rubrum</i> (4)	CC	6.8		Km para sacarosa= 120 mM	
<i>Klebsiella sp.</i> (6)	EP	6-6.5	35 (de mayor actividad)	Km para sacarosa = 120 mM	Se inhibe con Hg^{2+} , Ag^+ 1mM. EDTA 10mM la inhibe ligeramente. Reacción negativa con PCMB indica ausencia de grupos SH en el sitio activo de la enzima.
<i>Klebsiella planticola</i> MX-10 (11)	EIA	5.6	20		Produce 65% isomaltulosa y 30% trehalulosa. PM = 63,000 Da
<i>Ps. mesoacidophila</i> (7)	EP	5.5-6.5	20	Km para sacarosa= 19.2 mM Ki por producto= 170 mM	Produce principalmente trehalulosa Se inhibe con Hg^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Ag^+ , Pb^{2+} P. Isoelectrico = 5.4; PM = 63,000 Da

CC. Células completas; CIA. Células inmovilizadas en alginatos; EP. Enzima purificada; EIA. Enzima inmovilizada en alginatos; E. Enzima libre, no purificada.

(1) Cheetham, 1984; (2) Cheetham, 1982; (3) Mc Allister et al., 1990; (4) Takazoe, 1989; (5) Cheetham, 1987; (6) Park et al., 1992; (7) Nagai, 1994; (8) Nakajima, 1984; (9) Nakajima, 1988; (10) Tinoco, 1997; (11) Tsuyuki, et al., 1992.

3.3.2. Mecanismos de reacción.

a) *Erwinia rhapontici*.

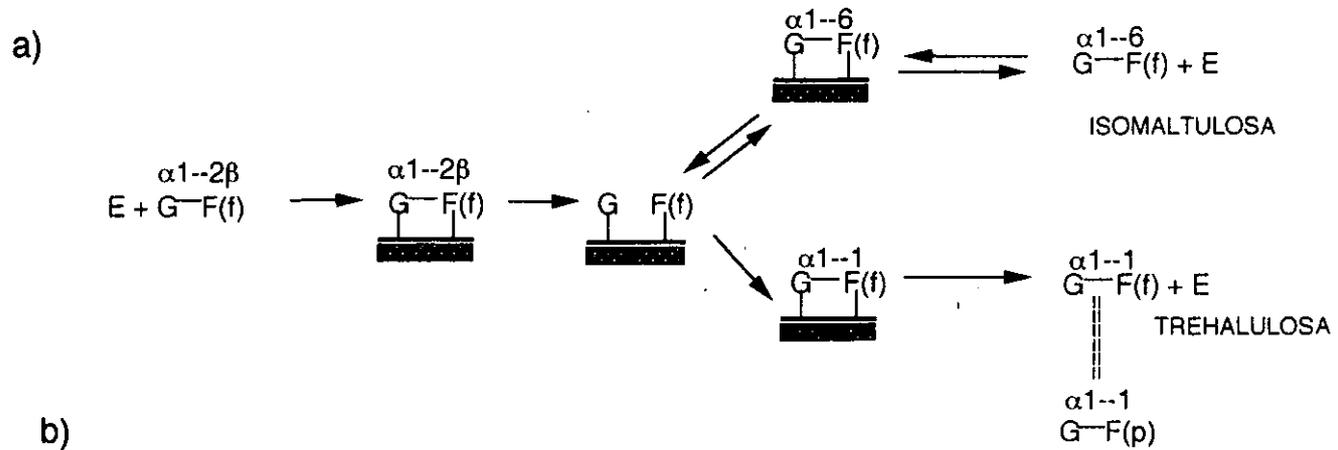
De acuerdo con los estudios realizados por Cheetham (1984), la enzima de *E. rhapontici* convierte sacarosa (marcada) en isomaltulosa con un rendimiento aproximado del 85%. Se obtiene también trehalulosa [neologismo propuesto por la analogía con la lactosa/lactulosa respecto al enlace 1-1 que presenta este disacárido, (Hall, 1982)] y glucosa y fructosa libres en rendimientos de 5% y 6%, respectivamente. No se reporta formación de oligosacáridos, lo que muestra que el agua y los disacáridos obtenidos, son aceptores débiles. La isomaltulosa formada específicamente de sacarosa marcada radioactivamente, puede hidrolizarse por la acción de la isomaltulosa sintasa de *E. rhapontici* para dar glucosa y fructosa marcadas. La isomaltulosa no puede ser convertida a trehalulosa empleando la isomaltulosa sintasa y/o viceversa y tanto la isomaltulosa como la trehalulosa no pueden ser convertidas a sacarosa al incubarlas con esta enzima. La trehalulosa obtenida, se encuentra presente 33% en forma de fructofuranosa y 66% como fructopiranososa.

En estudios hechos con enzima impura de *E. rhapontici* por Cheetham (1984), se ha encontrado que largos periodos de incubación causan un aumento en la concentración de isomaltulosa hasta alcanzar un máximo y luego se transforma lentamente en trehalulosa. Esto se atribuye a la propia isomaltulosa sintasa y no a otras enzimas contaminantes; en 1964 se estudiaron células de *S. plymuthica* y *P. rubrum* con radioactividad y concluyeron que es la misma actividad glucosiltransferasa la responsable de este hecho; lo anterior es contradictorio con lo reportado por Cheetham en 1987, ya que propone un mecanismo de transglucosilación intramolecular que posee el mismo intermediario para isomaltulosa y trehalulosa que únicamente utiliza glucosa y fructosa proveniente de sacarosa. La reacción no es mediada por dos enzimas diferentes que se encuentren asociadas, ni con una sola enzima que posea dos sitios activos con diferentes especificidades (Yourno et al., 1970). Esto se comprueba al observar que los monosacáridos exógenos marcados no se incorporan a ningún disacárido al adicionarlos solos o con sacarosa; y porque estos monosacáridos, no afectan la proporción de los productos formados y el consumo de sacarosa. Se piensa que existe un intermediario enzima-glucosa, ya que si la glucosa estuviera libre, podrían formarse azúcares como trehalosa, isomaltosa, maltosa, maltulosa y/o maltotriosa (Cheetham, 1984).

Una lógica semejante implicaría la existencia de un complejo enzima-fructosa, que se propone como otra alternativa del mecanismo. La especificidad absoluta al sustrato que posee la enzima y el hecho de que no reaccione y produzca monosacáridos, también implica que existan múltiples sitios de unión entre la sacarosa y la enzima (**Figura 3A**).

Este mecanismo se propone, considerando la unión de la sacarosa con la enzima, formando un “enlace o puente” seguida de la hidrólisis (Cheetham, 1987), y posteriormente de la reacción de transferencia de la glucosa a los grupos hidroxilo de los carbonos 6 y 1 de la fructofuranosa respectiva (**Figura 3A**) (Cheetham, 1984 y Mc Allister et al., 1990). Sorprendentemente, la formación de isomaltulosa requiere que el residuo de fructosa rote aproximadamente 180° , mientras que la trehalulosa no necesita de una rotación tan grande y presumiblemente se forma antes de que el complejo enzima-fructosa pueda rotar.

Otra alternativa de mecanismo menos probable, es la que contempla únicamente la unión de la enzima con la glucosa, formando un complejo enzima-glucosa y entonces éste reaccionaría con la fructosa que quedaría libre ya sea en forma de piranosa o de furanosa. La isomerización de la furanosa a piranosa con la subsecuente reacción a trehalulosa (**Figura 3B**) no es muy factible, ya que la glucosilación puede ocurrir antes de la mutarrotación y se formarían disacáridos con uniones β , lo cual no se observa. Quizá la fructosa se mantiene en su configuración de furanosa debido a su asociación con aminoácidos reactivos en el sitio activo de la enzima. Una reacción vía fructosa de cadena abierta, no es factible, tal como lo demuestra la R.M.N., ya que las cantidades presentes son muy pequeñas y la reacción no se inhibe con xilitol o manitol, los cuales pueden formar complejos con la fructosa acíclica (Cheetham, 1984).



b)

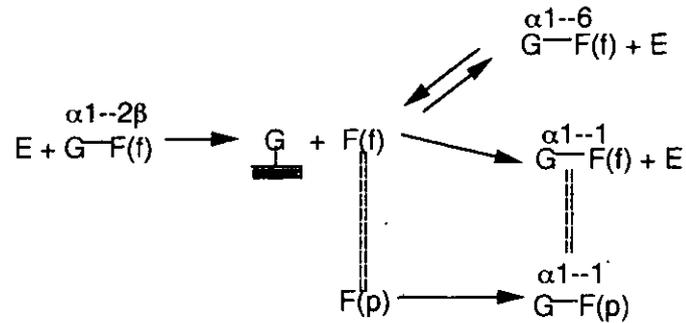


FIGURA 3. MECANISMOS PROPUESTOS PARA LA FORMACION DE ISOMALTULOSA Y TREHALULOSA A PARTIR DE SACAROSA.

G Glucopiranososa; F(f) Fructofuranosa; F(p) Fructopiranososa; E y  Enzima.

b) *Protaminobacter rubrum*.

En un proyecto anterior dentro del grupo de investigación en tecnología enzimática del IBT, se estudió la especificidad de la *ims* de *P. rubrum* y se encontró que la enzima es capaz de transferir el residuo de glucosa (proveniente de la sacarosa) al metanol, formándose así metil-glucósido. Para el resto de las moléculas estudiadas no se observó transferencia de glucosa y/o fructosa; sin embargo, los resultados obtenidos revelan el carácter de glucosiltransferasa de la enzima (Tinoco, 1997).

Adicionalmente, dos diferentes grupos de investigación japoneses han realizado estudios acerca del mecanismo de reacción que lleva a cabo la *ims* en *P. rubrum*. El primero de ellos (Fuji et al., 1985) llevó a cabo reacciones de aceptor utilizando p-nitrofenil- α -D-glucósido como donador y nueve aceptores diferentes, entre ellos: sorbosa y fructosa, obteniendo en el primer caso: glucosilsorbosa (15.6%) y en el segundo caso: isomaltulosa (7.8%) y trehalulosa (8.3%). Cuando únicamente está presente la sacarosa como sustrato, se obtiene una relación de isomaltulosa: trehalulosa de 8:1, en cambio, con fructosa como aceptor y p-nitrofenil- α -D-glucósido como donador, la relación cambia notoriamente: 1:1. La explicación a este hecho es la siguiente:

Por lo regular, la fructosa libre se encuentra en un equilibrio piranosa:furanosa 70:30. Como piranosa, el hidroxilo del carbono 1 está más disponible y por eso se obtiene una relación 1:1 cuando se utiliza fructosa libre como aceptor. Como furanosa, el hidroxilo del carbono 1 no está disponible, en cambio el hidroxilo del carbono 6, sí. En la molécula de sacarosa, la posición 1 de la fructosa está impedida estéricamente porque el glucosilo unido al hidroxilo del carbono 2 está muy cercano, además, la fructosa está como furanosa y por ello el hidroxilo del carbono 6 está más libre y disponible para reaccionar, obteniéndose así una relación 8:1 de isomaltulosa y trehalulosa. Es importante considerar que esta propuesta contempla únicamente la participación de los grupos hidroxilo de los carbonos 1 y 6 debido a que son primarios y su reactividad es mayor que la de los alcoholes secundarios y terciarios aún dentro de una misma molécula (Fuji et al., 1985).

Estos mismos autores reportan la formación de isomaltulosa e isomelezitosa en muy bajas concentraciones y a cortos tiempos de incubación, es por ello que proponen una posible ruta de síntesis de isomaltulosa:



El otro grupo de investigadores (Kakinuma et al., 1998) realizó estudios cinéticos empleando análogos sintéticos de la sacarosa, a partir de los cuales sugieren que:

1. El paso limitante de la reacción es el de la ruptura del intermediario glicosil-enzima ya que el cambio del sustituyente 1' afecta significativamente la k_{cat} .
2. Se involucra un estado de transición completamente protonado del tipo oxocarbanión (glicosil-catiónico) con una hibridación sp^3 .
3. El comportamiento de la enzima en el mecanismo de reacción, se asemeja a las α -glucosidasas, cuyas actividades son inhibidas en presencia de azoazúcares. La actividad de la enzima también fue inhibida por dichos compuestos.

De ésta manera, los autores proponen una estructura del estado de transición en donde dos grupos carboxilatos representan los grupos catalíticos y uno de ellos es utilizado para la protonación del oxígeno saliente. En la **Figura 4** se presentan el mecanismo de reacción y el estado de transición propuestos por Kakinuma y cols. (1998).

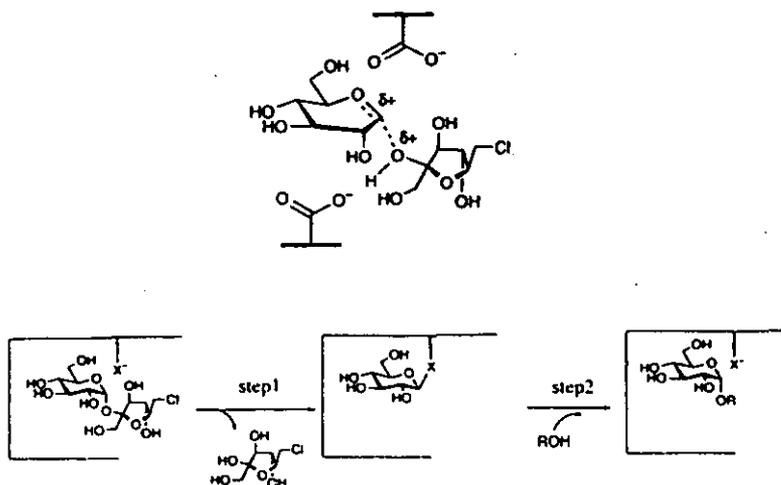


Figura 4. Mecanismo de reacción y estado de transición propuestos para la reacción catalizada por la isomaltulosa sintasa de *P. rubrum*. Tomada de Kakinuma, et al., 1998.

3.3.3. Producción de la enzima.

La isomaltulosa sintasa, es una enzima inducible en condiciones aeróbicas en medios con sacarosa (Takazoe, 1989). Los requerimientos nutricionales de las bacterias no son exigentes por lo que un medio que contenga fuente de C,N,P,S y sales son suficiente para el crecimiento del microorganismo (Huang et al., 1998).

En la **Tabla V** se presenta un resumen de los medios de cultivo empleados para crecer el microorganismo y producir de la enzima.

Tabla V. Medios de cultivo empleados para el crecimiento de *P. rubrum*.

Microorganismo	Sacarosa (%)	Fuente de Nitrógeno	Sales
<i>Klebsiella sp.</i> (1)	4	Peptona 1% Extracto de carne 0.4%	
<i>P. rubrum</i> CBS 574.77 (2)	5	Caldo de pollo.	
<i>E. rhapontici</i> NCPPB 1578 (3)	4	Peptona 1% Extracto de carne 0.4%	
<i>S. plymuthica</i> ATCC 15928 (4)	4	Peptona bacteriológica 10% Polvo lab-lemco 0.4%	
<i>Ps. Mesoacidophila</i> MX-45 (5)	Melazas, 10	Extracto de carne 0.3% Extracto de levadura 0.5% Peptona 1%,	NaCl 0.3% Na ₂ HPO ₄ 0.2%
<i>Klebsiella planticola</i> CCRC-19112 (6)	7	Soya Trypticase 3% Bactotripton 2%	NaCl 0.5%
<i>Klebsiella planticola</i> MX-10 (7)	10	Extracto de carne 0.3% Extracto de levadura 0.5% Peptona 1%	NaCl 0.3% Na ₂ HPO ₄ 0.2%
<i>P. rubrum</i> NRRL B-2348 (8)	2	Extracto de levadura 2%,	K ₂ HPO ₄ 2%, MgSO ₄ 0.02%, CaCl ₂ 0.005%, FeSO ₄ 0.001%, MnSO ₄ 0.001%, NaCl 0.001%

(1) Park et al., 1992; (2) Fuji et al., 1985; (3) Cheetham, 1984; (4) Mc. Allister et al., 1990; (5) Nagai et al., 1994; (6) Huang et al., 1998; (7) Tsuyuki et al., 1991; (8) Tinoco, 1997.

Las condiciones de cultivo varían también conforme la bacteria, sin embargo la generalidad oscila en 30°C, pH 7, agitación entre 200 y 250 rpm's y de 12 a 24 horas de crecimiento. Las concentraciones de oxígeno no son mencionadas en ningún caso.

La enzima de *E. rhapsontici* que se encuentra en el espacio periplásmico de la célula puede extraerse mediante un choque osmótico. Sin embargo, se obtiene acompañada de otras enzimas periplásmicas como la fosfatasa ácida y pequeñas cantidades de enzimas citoplasmáticas. Otros métodos que resultan menos exitosos para la extracción de isomaltulosa sintasa en *E. rhapsontici* son: sonicación, lisis celular, tratamiento con detergentes y agitador de Mickle. La mayor parte de ellos tiene el inconveniente de afectar negativamente la actividad específica (Cheetham, 1984).

En el caso de las enzimas de *Klebsiella sp.*, *S. plymuthica* y *P. rubrum* que son intracelulares, las células se rompen por sonicación y se obtiene el extracto enzimático intracelular, el cual se purifica y/o se inmoviliza para ser estudiado (Park et al., 1992; Mc. Allister et al., 1990 y Tinoco, 1997). En otras ocasiones, se utilizan las células completas y no es necesario extraer la enzima (Tsuyuki et al., 1992 y Huang et al., 1998).

3.3.4. Especificidad de la enzima.

En años recientes, los estudios acerca de la especificidad de la enzima han aumentado considerablemente. A través de la utilización de diferentes sustratos y aceptores se ha profundizado en el comportamiento de la isomaltulosa sintasa.

En *P. rubrum* CBS 547.77 se estudió tanto la especificidad del sustrato como del aceptor. Para el primer caso, se reporta que la enzima inmovilizada reconoce a la sacarosa, isomaltulosa, trehalulosa y rafinosa como sustratos obteniéndose los respectivos productos de transglucosilación e hidrólisis. Al analizar su acción sobre sustratos no naturales como p-nitrofenil- α -D-glucósido y Fenil- α -D-glucósido hubo transferencia del residuo glucosilo al agua, obteniéndose glucosa libre (Fuji et al., 1985 y Nakajima, 1988). Para estudiar la especificidad por aceptor, estos mismos autores utilizaron el p-nitrofenil- α -D-glucósido como donador y nueve diferentes aceptores, de los

cuales, solamente la D-fructosa y L-sorbosa dieron reacción positiva obteniéndose isomaltulosa (7.8%), trehalulosa (8.3%) y glucosil sorbosa (15.6%), respectivamente.

Kakinuma y cols. (1994) estudiaron la especificidad por el aceptor de células inmovilizadas de *P. rubrum*, *S. plymuthica* y *E. rhapsontici* utilizando derivados del dioxolano como donador con el objeto de crear potenciales “bloques de construcción” homólogos del glicoglicerol ampliamente cotizados en síntesis orgánica. Con las dos primeras cepas obtuvieron muy bajos porcentajes de glucosilación, pero con *E. rhapsontici* se obtuvieron mayores rendimientos.

En un estudio más reciente, Kakinuma y cols (1996) trabajan con la cepa de *P. rubrum* para llevar a cabo transferencias intermoleculares. Sabiendo que la enzima de esta bacteria también cataliza la transglucosilación de sacarosa a arabinosa (obteniendo 5-O- α -D-glucopiranosil-D-arabinósido), desarrollaron por separado derivados de la sacarosa bloqueados en las posiciones 1 y 6 para impedir la formación de isomaltulosa y favorecer la transglucosilación intermolecular. Utilizando veinte aceptores diferentes, lograron obtener dos productos en rendimientos del 3 y 21%.

La enzima de *E. rhapsontici* es específica para la sacarosa como sustrato, por lo que únicamente utiliza glucosa y fructosa proveniente de sacarosa. Se ensayó con una variedad de azúcares incluyendo maltosa, lactosa, rafinosa, galactosa, arabinosa y manosa tanto solas como con sacarosa, sin obtener reacción. Dicha especificidad por el sustrato, donador y aceptor es sorprendente porque la sacarosa es una molécula pequeña y porque la isomaltulosa sintasa de otros microorganismos utilizan bastante bien maltosa, arabinosa y glucosa como aceptores; *E. rhapsontici* no actúa en galacto-sacarosa, epímero en C-4 de la sacarosa (Cheetham, 1984 y 1987).

La acción de las células de *S. plymuthica* sobre sacarosa en presencia de manosa o arabinosa, produce α -D-glucosil-manósido ó α -D-glucosil-arabinósido. En el análisis de especificidad respecto al sustrato para la enzima pura de *S. plymuthica* resultó negativo para todos los di y trisacáridos (maltosa, maltotriosa, lactosa, celobiosa, isomaltulosa, trehalosa, turanosa y rafinosa), excepto para sacarosa (Mc Allister et al., 1990).

En la **Tabla VI**, se condensan los principales resultados de los estudios de especificidad de la isomaltulosa sintasa presente en diferentes organismos.

Tabla VI. Especificidad de la isomaltulosa sintasa presente en diferentes organismos.

Microorganismo	Especificidad	Referencia
<i>K. planticola</i> CCRC 19112	Reconoce únicamente a la sacarosa como sustrato. Negativo para isomaltulosa, trehalosa, lactosa, maltosa, rafinosa, glucosa + fructosa.	Huang et al., 1998.
<i>E. rhapsodic</i> NCPB 1578	Maltosa, lactosa, rafinosa, galactosa, arabinosa y maltulosa no reaccionan con o sin sacarosa.	Cheetham, 1984.
<i>S. plymuthica</i> ATCC 15928	Reconoce como aceptores a manosa, arabinosa y agua. Como sustrato únicamente a la sacarosa. Negativo para maltosa, maltotriosa, lactosa, celobiosa, isomaltulosa, trehalosa, turanosa y rafinosa.	McAllister et al., 1990.
<i>P. rubrum</i> <i>S. plymuthica</i> <i>E. rhapsodic</i> .	Transfieren el residuo glucosilo a cetosas y derivados de dioxolanos a partir de un donador sintético: 6-cloro-6-deoxisacarosa.	Kakinuma et al., 1994.
<i>P. rubrum</i> CBS 574.77	Reconoce como sustrato a la sacarosa, isomaltulosa, trehalulosa, rafinosa, paranitrofenil- α -D-glucósido y fenil- α -D-glucósido. Negativo para maltosa, maltulosa, turanosa, lactosa y metil- α -D-glucósido. Aceptores: fructosa, L-sorbosa y agua. Negativo para: glucosa, L-rhamnosa, manosa, galactosa, D-arabinosa, L-arabinosa, xilosa.	Fuji et al., 1985. Nakajima, 1988.
<i>P. rubrum</i> CBS 574.77	Lleva a cabo transferencias inter e intramoleculares utilizando derivados de la sacarosa (1'6' disustituída) como donador y 20 diferentes aceptores.	Kakinuma et al., 1996.
<i>P. rubrum</i> CBS 574.77	Lleva a cabo transglucosilaciones intramoleculares de sacarosa a isomaltulosa y también transglucosilaciones intermoleculares de 7 derivados sintéticos de la sacarosa a un donador sintético (Bencil- β -D-arabinofuranósido).	Kakinuma et al., 1998.
<i>P. rubrum</i> NRRL B-2348	Reconoce como aceptor al metanol. Negativo para etanol, fructosa, glucosa y maltosa. Reconoce a la sacarosa como sustrato. Negativo para kestosa, nistosa, fructosil-nistosa y difructosil-nistosa.	Tinoco, 1997.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Reactivos y equipos utilizados.

4.1.1. Reactivos:

Los reactivos y medios de cultivo empleados en el presente trabajo fueron adquiridos en las siguientes casas distribuidoras:

- ◆ Bioxon, Becton Dickinson.
- ◆ Difco Lab.
- ◆ J.T. Baker.
- ◆ Merck de México, S.A. de C.V.
- ◆ Sigma-Aldrich Química, S.A. de C.V.
- ◆ ICN, Biomedicals, Inc.

4.1.2. Equipos:

Los equipos utilizados, se describen a continuación:

- ◆ Incubadora New Brunswick Scientific, Co. Inc. Serie 25.
- ◆ Espectrofotómetro Beckman DU 650.
- ◆ Autoclave TOMY Sciko, Co. LTD. SS-325E.
- ◆ pHmetro Corning 125.
- ◆ Centrifuga Beckman JH-2S.
- ◆ Sonicador Soniprep 150 MSE.
- ◆ Microfuga Beckman 12.
- ◆ Baño de temperatura controlada Polytherm Science/Electronics, Inc.
- ◆ Horno con vacío Precision Scientific, Inc.
- ◆ Equipo para filtración al vacío Millipore.

4.2. Técnicas analíticas empleadas.

4.2.1. Cuantificación de isomaltulosa por el método del Ácido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS)

(Sumner, & Howell, 1935).

a) Preparación de la solución patrón:

- ◆ Disolver en agua destilada 0.1 g de isomaltulosa y aforar a 10 mL.

b) Técnica:

- ◆ Colocar alícuotas desde 0.1 hasta 4 mL de la solución patrón en diferentes tubos de ensayo.
- ◆ Aforar con agua destilada a 10 mL.
- ◆ Tomar 0.5 mL de cada solución y agregar 0.5 mL de DNS [se prepara disolviendo 300 gr. de tartrato de sodio y potasio, 16 gr. de NaOH y 10 gr. de ácido 3,5-dinitrosalicílico en agua destilada y posteriormente se afora a 1 Lt. (Sumner, & Howell, 1935)].
- ◆ Poner a ebullición en un baño durante 5 minutos.
- ◆ Enfriar en un baño de hielo durante 5 minutos.
- ◆ Adicionar a cada tubo 5 mL de agua destilada.
- ◆ Agitar los tubos.
- ◆ Leer a 540 nm contra un blanco (El blanco se prepara de la misma manera pero se emplea agua en lugar de muestra). La curva estándar se presenta en la **Figura 5**.

Por otro lado, para la toma de muestra, se procede de la siguiente forma:

- ◆ Tomar una alícuota de 0.5 mL con la dilución adecuada.
- ◆ Agregar 0.5 mL de DNS.
- ◆ Proceder de la misma manera que con la curva patrón.

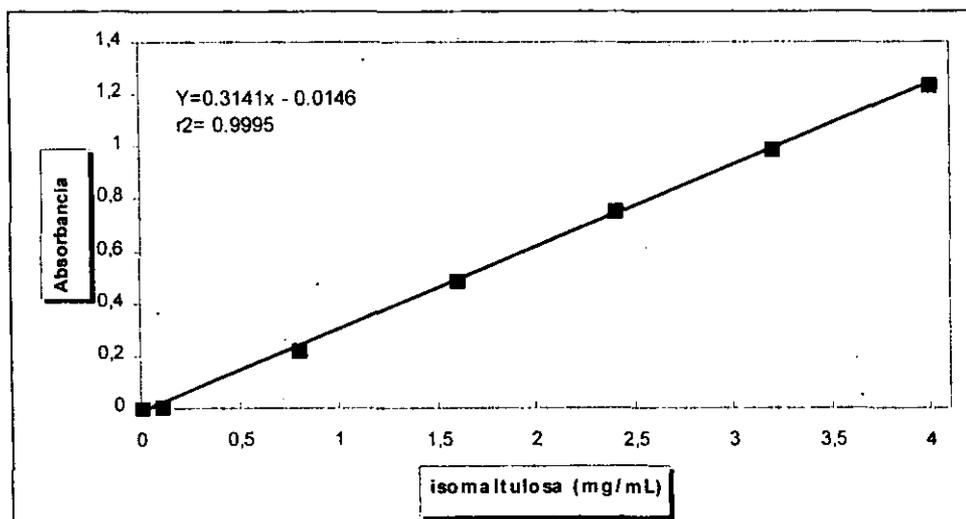


Figura 5. Curva estándar de isomaltulosa empleando el método de DNS. Se grafica la absorbancia a 540 nm vs. concentración de isomaltulosa (mg/mL).

4.2.2. Determinación de actividad isomaltulosa sintasa por el método DNS.

Para medir la actividad enzimática, se utilizó como sustrato sacarosa, a concentración final de 10% p/v, la cantidad de enzima (como células completas) puede variar de 0.5 a 1 U/mL en amortiguador de fosfatos 0.1M pH=6, preincubando la mezcla sustrato-enzima por 5 minutos a una temperatura de 30°C. Se tomaron muestras durante los primeros 15 minutos de la reacción y se determinó la cantidad de isomaltulosa por el método de DNS, leyendo la absorbancia a 540 nm. Una **unidad de actividad isomaltulosa sintasa** se define como la cantidad de enzima que produce un μmol de isomaltulosa/min a pH=6 y 30°C y sacarosa 10%. La **actividad específica** se define como las unidades de isomaltulosa sintasa/ mg: de proteína.

4.2.3. Determinación de proteína total por el método de Lowry (Adaptación). (Lowry et al., 1951).

Para esta determinación se emplearon las siguientes soluciones:

- A) Na_2CO_3 al 2% en NaOH 0.1M.
- B) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 0.5%.
- C) Tartrato de sodio y potasio al 1%.
- D) Soluciones C + B en relación 1:1 v/v.
- E) Soluciones D + A en relación 1:49 v/v preparada el día del ensayo.
- F) Reactivo Folin-Ciocalteu y agua destilada en relación 1:2 preparado el día del ensayo.

La técnica se realizó de acuerdo al siguiente protocolo:

- ◆ Tomar 1mL de muestra (diluida 1:10).
- ◆ Agregar 5 mL de reactivo E.
- ◆ Agitar y dejar en reposo 10 minutos.
- ◆ Agregar 0.5 mL de reactivo Folin-Ciocalteu.
- ◆ Agitar y dejar en reposo 30 minutos.
- ◆ Leer a 590 nm contra un blanco. El blanco se prepara de la misma manera pero se emplea agua en lugar de muestra.

Preparar una curva estándar con albúmina sérica bovina con concentraciones de 0 a 200 $\mu\text{g/mL}$. El resultado se presenta en la **Figura 6**.

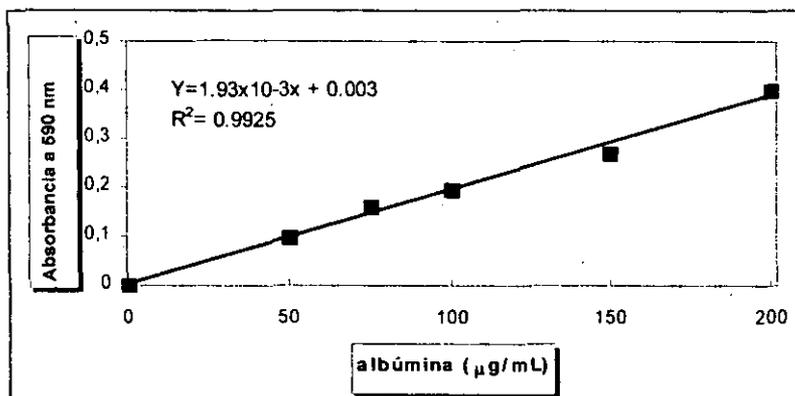


Figura 6. Curva estándar de proteína empleando albúmina sérica bovina como referencia, según el método de Lowry, y obteniendo absorbancia a 590 nm.

4.2.4. Identificación de productos por Cromatografía en Capa Fina (CCF).

Se aplica 1 μL de cada muestra en una cromatoplaque de tipo: HPK Silica Gel 60 \AA , 200 μm grosor Whatman Inc previamente aminada con una solución que contiene: 1 mL de dietanolamina y 60 μL de ácido acético glacial en 100 mL de acetonitrilo grado HPLC (Joseph et al., 1986). La fase móvil empleada consiste en una mezcla de acetonitrilo:agua (8:2); la placa se roció con una solución alcohólica de α -naftol al 2.5% y se reveló a 100°C (Joseph et al., 1986). Los R_f 's observados para los estándares resultaron ser de: xilosa 0.5, fructosa 0.4, glucosa 0.36, sacarosa 0.27, isomaltulosa 0.24 y maltosa 0.23.

4.2.5. Identificación y cuantificación de productos por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

Se trabajó con un equipo de HPLC (Waters), compuesto de un sistema controlador (Waters 600 E), un inyector automático (Waters 717 plus) y un detector de índice de refracción (Waters 410).

Las condiciones de análisis consistieron en:

- ◆ Columna para carbohidratos aminada (Waters para HPLC de 4.6 x 250 mm. Sílica amorfa derivatizada con aminopropilmetilsilil. 60 Å, 4 µm.)
- ◆ Fase móvil: mezcla de Acetonitrilo:Agua (80:20).
- ◆ Flujo de la fase móvil: 1.4 mL/min.
- ◆ Sensibilidad del detector: 16.
- ◆ Tiempo de corrida de cada muestra: entre 7.5 y 12 minutos.

Las muestras se preparan previamente diluyendo según sea necesario y centrifugando a 12,000 rpm/5 minutos. El volumen inyectado de cada muestra fue de 10µL. Se obtuvieron curvas patrón aplicando 3, 6, 9, 12 y 15 µL de una solución estándar de fructosa 0.3%, glucosa 0.3%, xilosa 0.3%, sacarosa 0.6%, isomaltulosa 0.6% y maltosa 0.6%. La cuantificación de los compuestos se realizó relacionando concentraciones conocidas de ellos con las áreas correspondientes. Los tiempos de retención observados para los diferentes azúcares fueron: fructosa 4.3 minutos, glucosa 4.8 minutos, sacarosa 6.7 minutos, isomaltulosa 7.2 minutos y trehalulosa 8.1 minutos.

4.2.6. Determinación de peso seco.

La concentración de biomasa se determinó en forma indirecta midiendo la densidad óptica e interpolando de una curva estándar de D.O. vs peso seco que se muestra en la **Figura 7**. La determinación de peso seco se realizó según lo reportado por Cooney (1981) de la siguiente manera:

Se secaron membranas de acetato de celulosa de 0.45 µm de poro y 45 mm de diámetro (marca Millipore) hasta peso constante en un horno con vacío (marca Precision Scientific, Inc.) a 60°C. Las membranas se colocaron en el equipo de filtración (Millipore) y se humedecieron uniformemente con agua destilada. El cultivo a filtrarse se homogenizó y se procedió a filtrar. La membrana se secó hasta peso constante a 60°C en el horno con vacío. El peso de la muestra se obtuvo restando el peso inicial del peso final.

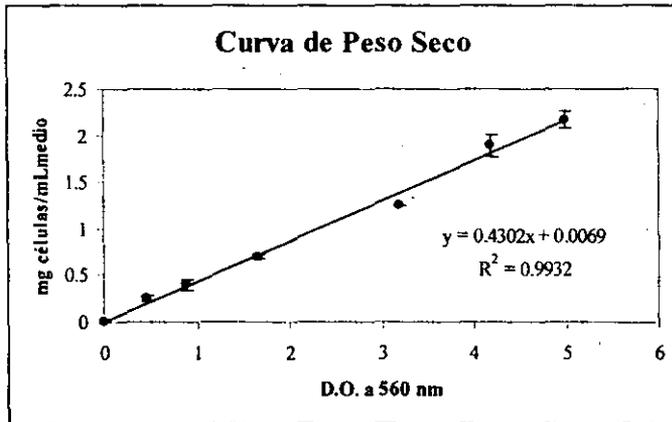


Figura 7. Curva de Peso Seco.

4.3. Procedimiento experimental.

4.3.1. Almacenamiento de la cepa productora de isomaltulosa sintasa.

Se partió de la cepa liofilizada de *Protaminobacter rubrum* NRRL B-2348, la cual, se creció en 3 mL de agar nutritivo a 30°C/200 rpm/13 hrs. Posteriormente este preinóculo se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 125 mL conteniendo 50 mL del medio descrito en la **Tabla VII**, utilizando sacarosa o glucosa como fuente de carbono, se incubó bajo las mismas condiciones hasta alcanzar una $D.O._{560\text{ nm}} = 3.5$. Una vez alcanzado este punto, se transfirieron 2 mL de cultivo a tubos de vidrio que contenían 2 mL de glicerol 60% (previamente esterilizado durante 15 minutos/121°C a una presión de 15 lb/in²). Se almacenan a 0°C y se emplean como inóculos para las fermentaciones posteriores.

4.3.2. Fermentaciones utilizando diferentes fuentes de carbono.

Se preparó un preinóculo, a partir del glicerol obtenido, inoculando 50 mL de medio en un matraz Erlenmeyer de 250 mL; se creció a 30°C/200 rpm hasta alcanzar una D.O. entre 3 y 3.5 y entonces se procedió a inocular (con 10 mL del preinóculo) un matraz Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 90 mL de medio.

La composición de la base del medio de cultivo empleado para el crecimiento de *P. rubrum* se presenta en la Tabla VII. Una vez que los componentes fueron pesados y disueltos en agua destilada, se ajustó el pH a 7 con ácido ortofosfórico diluido 1:1 y se esterilizó en autoclave. La fuente de carbono se pesó por separado, se disolvió en 10 mL de agua destilada, se esterilizó en autoclave y se incorporó a la base del medio de cultivo ya esterilizado. Los compuestos utilizados como fuente de carbono fueron: glucosa, fructosa, sacarosa, isomaltulosa, xilosa, maltosa y glicerol; en algunos casos se emplearon mezclas de estos.

Es conveniente señalar que este medio se utiliza en la producción de dextran sacarasa de *L. mesenteroides* (Tsuchiya et al., 1952) y difiere de los empleados para la producción de isomaltulosa sintasa en diversas bacterias (ver Tabla V), entre ellas *P. rubrum*, y fue modificado debido a que los medios reportados en la literatura son indefinidos, se componen principalmente de sacarosa, peptona y extracto de carne, lo que hace que no se tenga un control en los nutrientes presentes. El medio utilizado en el presente trabajo es menos complejo, la disponibilidad de sus componentes es mayor y el crecimiento de la bacteria, así como la producción de la isomaltulosa sintasa no se vieron afectados por este parámetro, obteniéndose resultados satisfactorios como se menciona posteriormente en el capítulo 5.

Tabla VII. Composición del medio de cultivo para el crecimiento de *Protaminobacter rubrum*.

Concentración (g/L)	Componente
20	Fuente de carbono
20	Extracto de levadura
20	K ₂ HPO ₄
0.2	MgSO ₄ *7H ₂ O
0.05	CaCl ₂ *2H ₂ O
0.01	FeSO ₄
0.01	MnSO ₄ *7H ₂ O
0.01	NaCl

a) Toma de muestra.

Las fermentaciones se realizaron por triplicado; se tomaron asépticamente dos alícuotas a intervalos variables desde el tiempo cero y hasta que la fuente de carbono se agotó. Una muestra se utilizó para evaluar el crecimiento de *P. rubrum* determinando la D.O. a 560 nm. La otra muestra (2 mL) se utilizó para medir actividad isomaltulosa sintasa, concentración de proteína y para la cuantificación de sustrato y productos de la fermentación.

Las alícuotas de 2 mL fueron centrifugadas a 14,000 rpm/5 min; posteriormente, se separó el sobrenadante y se congeló a -20°C hasta el momento de su análisis. El paquete celular se lavó dos veces con una solución isotónica de NaCl 0.08% estéril, se resuspendió en 1 mL de solución amortiguadora de fosfatos 0.1M a pH 6 y fue almacenado a 4°C hasta el momento de su análisis.

Al término de cada fermentación se midió el pH de cada matraz.

Para confirmar la pureza de los cultivos, al concluir las fermentaciones se sembraron alícuotas de los mismos en placa y se incubaron por 24 horas, observándose crecimiento de colonias blancas que al microscopio dieron tinción de gram negativa y diplococos de tamaño pequeño (Green et al., 1982 y Urakami et al., 1981).

Al término de la fermentación, se centrifugó el contenido del matraz a 10,000 rpm/20 min (utilizando un rotor JA-14 Beckman, Serie 95-U 6657 y una centrífuga Beckman Model J2-21); se decantó el sobrenadante y se lavaron las células con una solución de NaCl 0.8% (estéril). Se centrifugó nuevamente (en las mismas condiciones), se decantó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en una solución amortiguadora de fosfatos 0.1M a pH=6.

b) Reacciones de síntesis de isomaltulosa.

En las fermentaciones con un sustrato diferente a la sacarosa, resultó imperante comprobar si la actividad encontrada correspondía realmente a isomaltulosa sintasa, por lo cual, se llevaron a cabo reacciones empleando sacarosa como sustrato esperando la formación de isomaltulosa. Las

condiciones de ensayo fueron las mismas que para el ensayo de actividad. La reacción se siguió durante varias horas tomando muestra a diferentes tiempos. A dichas muestras se les midió (en su caso) la cantidad de isomaltulosa producida por DNS y se identificaron los productos de reacción empleando CCF y HPLC.

4.3.3. Fermentación en dos etapas.

Se preparó un preinóculo a partir del glicerol crecido en sacarosa y almacenado a -20°C , inoculando con éste, 100 mL de medio en un matraz Erlenmeyer de 250 mL; se creció a $30^{\circ}\text{C}/200$ rpm hasta alcanzar una D.O. entre 3 y 3.5 y entonces se procedió a inocular con 10 mL de este cultivo un matraz Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 2 gr. de sacarosa disueltos en 5 mL de amortiguador de fosfatos 0.1 M a pH 6. Se incubó a las mismas condiciones hasta lograr la conversión total de sacarosa en isomaltulosa.

El consumo de sacarosa y conversión en isomaltulosa se monitorearon cada 15 minutos y una vez que la primera se aproximó a cero, se agregó el resto de los nutrientes del medio de cultivo (contenidos en un volumen de 84 mL), teniendo finalmente 100 mL.

El seguimiento de la segunda etapa de la fermentación se monitoreó como las fermentaciones anteriores. A las muestras se les dio el mismo tratamiento y análisis.

4.3.4. Reacciones empleando diferentes sustratos.

Se llevaron a cabo reacciones empleando isomaltulosa así como glucosa + fructosa como sustratos. Las condiciones de ensayo para la isomaltulosa fueron: pH 4.5, 6 y 7.5 durante 24 horas; en el caso de glucosa + fructosa solamente se ensayó a pH 6 durante 24 horas, al cabo de las cuales, se tomó una muestra para medir los productos obtenidos por CCF y HPLC.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Estabilidad de la cepa.

Durante el desarrollo de este trabajo la cepa se almacenó en glicerol 60% y fue resembrada cada dos meses para mantenerla. De acuerdo con lo reportado por Cheetham (1987), *P. rubrum* almacenado en glicerol tiene una vida media de 1444 horas, aproximadamente dos meses. Se realizaron periódicamente observaciones al microscopio para asegurar que no existiera algún cambio morfológico en la bacteria. Así mismo, durante los experimentos realizados no se percibió alguna modificación en el comportamiento o viabilidad del microorganismo que pudiera atribuirse a las resiembras.

5.2. Crecimiento de *P. rubrum* en el medio de cultivo reportado en la literatura.

Con el fin de determinar el efecto del medio de cultivo en el crecimiento y actividad enzimática de *P. rubrum* se implementó un medio de cultivo tomando como base las referencias bibliográficas presentadas anteriormente en la **Tabla V**. La composición de éste se presenta en la **Tabla VIII**.

Tabla VIII. Composición del medio de cultivo utilizado para la producción de la *ims* en otros microorganismos.

Nutriente	Concentración (%)
Sacarosa	2
Peptona	1
Extracto de Carne	0.5
K ₂ HPO ₄	0.2
NaCl	0.3

En una primera fermentación el crecimiento de la bacteria resultó menor al observado normalmente cuando se emplea el medio de cultivo habitual; igualmente, se registró una caída del pH de un valor de 7 (al inicio de la fermentación) a uno de 5.3. Inicialmente se creyó que la baja concentración de fosfatos utilizada no fue suficiente para regular adecuadamente el pH del medio durante el crecimiento de la bacteria, por lo que se realizó una segunda fermentación empleando 2% de fosfatos (11mM).

En la segunda fermentación que se llevó a cabo, no mejoró el crecimiento de la bacteria, de igual manera, se presentó una disminución del pH a 6.2 en el mismo intervalo de tiempo; adicionalmente, se observó que en ambos casos no se produjo actividad enzimática. Probablemente exista producción de ácidos orgánicos que acidifiquen el medio o bien la cantidad de fosfatos utilizada en el medio de cultivo, no resultó suficiente para mantener constante el pH. Por lo anterior se decidió no continuar los estudios con este medio de cultivo sino con el empleado para el crecimiento de *L. mesenteroides* (Tabla V).

5.3. Fermentaciones utilizando diferentes fuentes de carbono.

5.3.1. Crecimiento de *P. rubrum* en glucosa.

Se partió de un preinóculo crecido en glucosa, en fase exponencial. En la **Figura 8** se muestra la evolución de la fermentación con glucosa como fuente de carbono. Se observa una cinética de crecimiento lineal de 6 horas, posteriormente se inicia la fase estacionaria. La glucosa se consume por completo después de las 7.5 horas. El análisis de CCF que se ilustra en la **Figura 9**, no revela la aparición de algún producto. El pH final de la fermentación fue de 6.18. No se detectó actividad enzimática al inicio de la fermentación. Después de 10.5 horas, se percibe un ligero incremento en la actividad: 0.9 ± 0.03 U/mg P. Existe la posibilidad de que al ser la glucosa la fuente de carbono, se observen niveles basales de actividad *ims* debidas a una represión por glucosa o bien a que la glucosa no estimula la producción de la enzima.

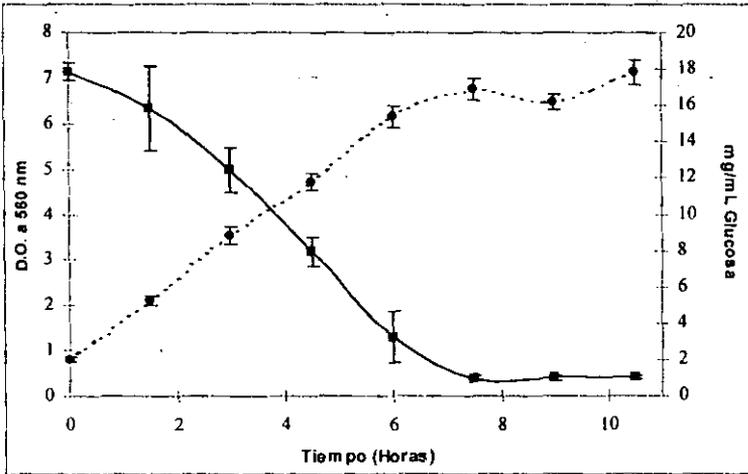


Figura 8. Cinética de crecimiento de *P. rubrum* en glucosa.
 ● D.O. a 560 nm; ■ mg/mL de glucosa.

1. ESTANDAR
2. MEDIO
3. PREINOCULO
4. TIEMPO=0
5. T=1.5 HRS
6. T=3 HRS
7. T=4.5 HRS
8. T=6 HRS
9. T=7.5 HRS
10. T=9 HRS
11. T=10.5 HRS
12. TIEMPO=0
13. T=1.5 HRS
14. T=3 HRS
15. T=4.5 HRS
16. T=6 HRS
17. T=7.5 HRS
18. T=9 HRS
19. T=10.5 HRS
20. ESTANDAR

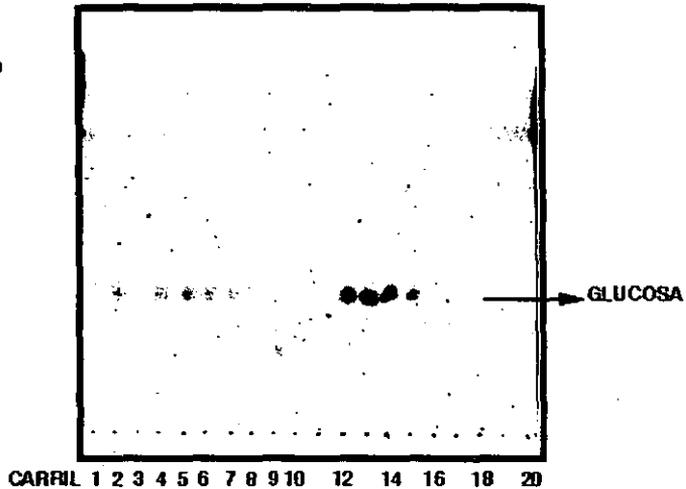


Figura 9. Cromatografía en capa fina de la fermentación de *P. rubrum* en glucosa.
 Se empleó una fase acetonitrilo:agua en relación 80:20.
 Se aplicó 1µL de cada muestra diluida previamente en relación 1:10.
 Los carriles 4 al 11 son muestras de los sobrenadantes del medio de cultivo a diferentes tiempos de fermentación. Los carriles 12 al 19 son duplicados de las mismas muestras.

5.3.2. Crecimiento de *P. rubrum* en fructosa.

Se partió de un preinóculo crecido en fructosa, en fase exponencial. En la Figura 10 se muestra la evolución de la fermentación con fructosa como fuente de carbono. En este caso, la cinética de crecimiento es lineal durante 7.5 horas, después de la cual la bacteria inicia la fase estacionaria. La fructosa se consume totalmente después de 9 horas. La CCF (Figura 11) muestra que únicamente existe consumo de sustrato y no hay formación de otro producto. El pH final de la fermentación fue de 6.2. La actividad al inicio de la fermentación fue de 1.1 ± 0.1 U/mg P y después de 10.5 horas aumentó a 3.1 ± 0.1 U/mg P. Nuevamente se confirmó que la actividad detectada fuese *ims* mediante la conversión de sacarosa en isomaltulosa utilizando las células crecidas en fructosa.

Al utilizar fructosa como fuente de carbono, se observa un incremento en la actividad *ims*, incluso llega a niveles equiparables con los encontrados con el inductor habitual: la sacarosa (Tinoco, 1997). Sin embargo, la ganancia de actividad a lo largo de la fermentación es mayor cuando se utiliza fructosa en vez de sacarosa, como se analizará mas adelante.

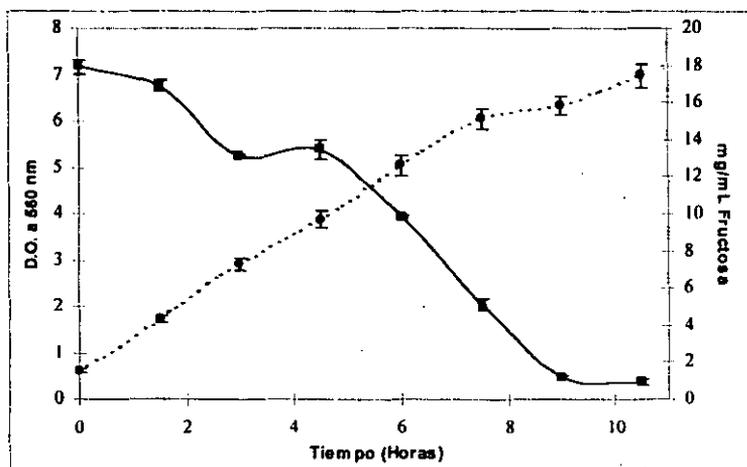


Figura 10. Cinética de crecimiento de *P. rubrum* en fructosa.
 ● D.O. a 560 nm; ■ mg/mL de fructosa.

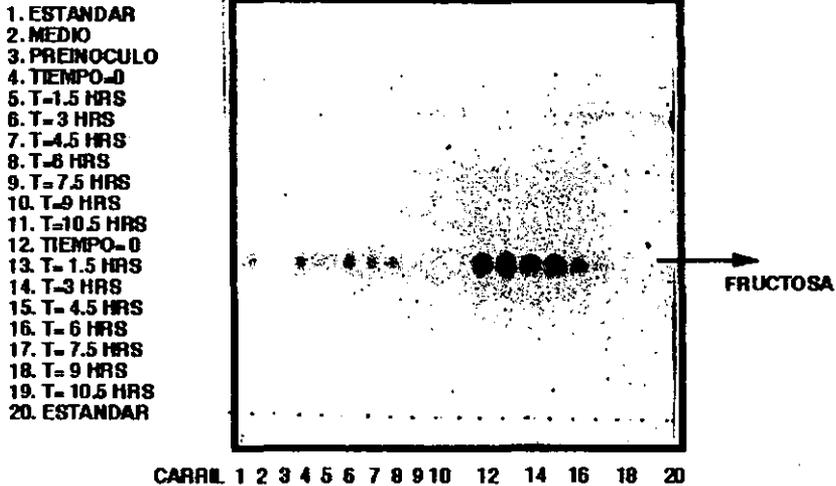


Figura 11. Cromatografía en capa fina de la fermentación de *P. rubrum* en fructosa.

Se empleó una fase acetónitrilo:agua en relación 80:20.

Se aplicó 1 μ L de cada muestra diluida previamente en relación 1:10.

Los carriles 4 al 11 son muestras de los sobrenadantes del medio de cultivo a diferentes tiempos de fermentación. Los carriles 12 al 19 son duplicados de las mismas muestras.

5.3.3. Crecimiento de *P. rubrum* en sacarosa.

Se partió de un preinóculo crecido en sacarosa, en fase exponencial. En la Figura 12 se muestra como transcurre la fermentación con sacarosa: existe una primera etapa de crecimiento desde el tiempo cero hasta aproximadamente 5 horas; después, el crecimiento disminuye y nuevamente aumenta simulando una curva diáuxica; éste comportamiento es claro al analizar la secuencia en el consumo del sustrato y posteriormente del producto: primeramente, la sacarosa, es convertida a isomaltulosa dentro de la primera etapa. En la segunda fase de crecimiento, la bacteria utiliza la isomaltulosa producida para crecer y es agotada después de 12 horas de fermentación. La Figura 13 ilustra la CCF de los sobrenadantes de la fermentación, en donde se aprecia la desaparición de sacarosa a las 3 horas y el posterior consumo de isomaltulosa hasta las 12 horas. El pH final de la fermentación resultó ser 6.24.

Al inicio de la fermentación se detectó una actividad de 3.8 ± 0.5 U/mg P, que aumentó ligeramente a 4.5 ± 0.05 a las 6 horas y se mantuvo en 4.2 ± 0.2 en las 12 y 15 horas de fermentación. La actividad al inicio de la fermentación proviene del preinóculo que fue crecido en sacarosa y evidentemente induce la producción de la enzima.

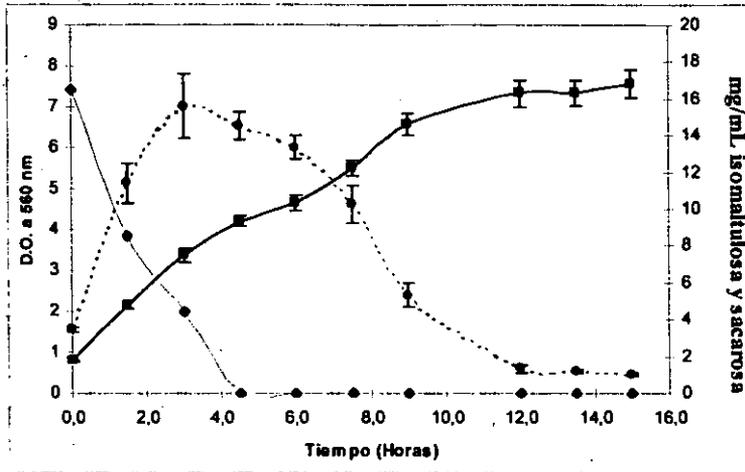


Figura 12. Cinética de crecimiento de *P. rubrum* en sacarosa.
 ■ D.O. a 560 nm; ● mg/mL de isomaltulosa; ◆ mg/mL de sacarosa.

1. ESTANDAR
2. MEDIO
3. PREINOCULO
4. TIEMPO= 0
5. T= 1.5 HRS
6. T= 3 HRS
7. T= 4.5 HRS
8. T= 6 HRS
9. T= 7.5 HRS
10. T= 9 HRS
11. T= 12 HRS
12. T= 13.5 HRS
13. T= 15 HRS
14. ESTANDAR

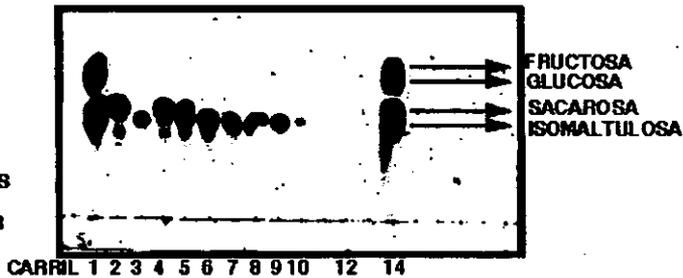


Figura 13. Cromatografía en capa fina de la fermentación de *P. rubrum* en sacarosa. Se empleó una fase acetonitrilo:agua en relación 80:20. Se aplicó $1\mu\text{L}$ de cada muestra (sobrenadante del medio de cultivo) diluida previamente en relación 1:10.

5.3.4. Crecimiento de *P. rubrum* en isomaltulosa.

Se partió de un preinóculo crecido en isomaltulosa, en fase exponencial. Al igual que en los otros tres casos, en esta fermentación se aprecia (en la **Figura 14**) que la cinética de crecimiento de la bacteria es lineal la mayor parte del tiempo; el consumo de la fuente de carbono es mucho más lento: deben transcurrir 12 horas para que se agote por completo. De acuerdo con lo que revela la CCF (**Figura 15**), la isomaltulosa desaparece conforme transcurre el tiempo; no se acumula glucosa o fructosa en el medio de cultivo, ni tampoco se forma sacarosa. El pH al final de la fermentación fue de 6.3. En este caso, también se encontró que las células obtenidas presentaron actividad. Lo sorprendente es que siendo el producto lo que se empleó como fuente de carbono, la actividad obtenida resultara mayor que en el caso de la sacarosa. Al inicio de la fermentación, las células presentaron una actividad de 4.3 ± 0.2 U/mg P y después de 12 horas, la actividad aumentó a 5.2 ± 0.3 U/mg P. Nuevamente se corroboró que la actividad producida fuese *ims*.

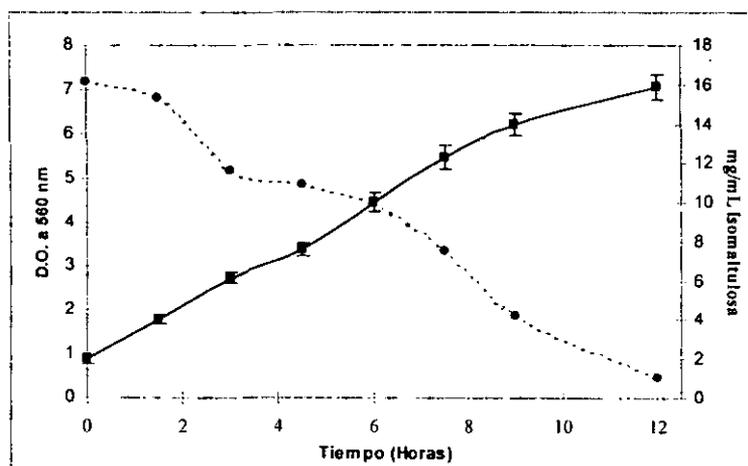


Figura 14. Cinética de crecimiento de *P. rubrum* en isomaltulosa.
 ■ D.O. a 560 nm; ● mg/mL de isomaltulosa.

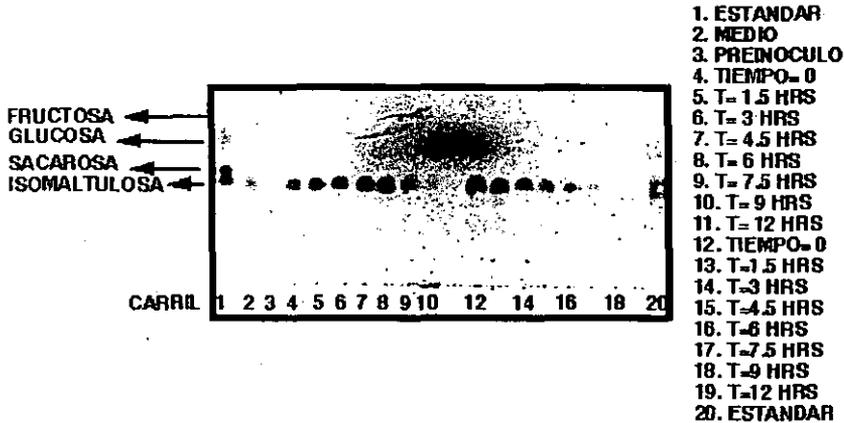


Figura 15. Cromatografía en capa fina de la fermentación de *P. rubrum* en isomaltulosa. Se empleó una fase acetonitrilo:agua en relación 80:20. Se aplicó 1 μ L de cada muestra diluida previamente en relación 1:10. Los carriles 4 al 11 son muestras de los sobrenadantes del medio de cultivo a diferentes tiempos de fermentación. Los carriles 12 al 19 son duplicados de las mismas muestras.

5.3.5. Control negativo sin fuente de carbono.

A raíz de que el medio utilizado durante este trabajo no es totalmente definido, surgió la inquietud de un posible efecto inductor de la actividad *ims* proveniente del extracto de levadura empleado como fuente de nitrógeno, para lo cual se realizó un control negativo creciendo a *P. rubrum* en el medio "base", esto es, sin fuente de carbono. Evidentemente el crecimiento fue muy lento, aún después de 9 horas de fermentación, la D.O fue menor de 4 unidades y después de 24 horas de fermentación aumentó a 5.8 debido a la lisis de las células. El pH final fue de 7.09.

No se detectó actividad enzimática en ningún punto de la fermentación, por lo que la hipótesis de una posible interferencia del extracto de levadura en la producción de la actividad *ims* fue descartada y se determinó entonces que el medio de cultivo podría seguir utilizándose sin ningún problema.

A partir de los resultados anteriores, se puede apreciar que las cinéticas de crecimiento presentan una tendencia lineal, lo cual se debe probablemente a una limitación de nutrientes dentro del medio de cultivo o bien a deficiencias de agitación y/o transferencia de O₂ dentro del sistema que hagan que la cinética que describe el crecimiento sea lineal, mas no que el crecimiento o duplicación de la bacteria sea lineal y no exponencial; por otro lado, los preinóculos utilizados para iniciar cada una de las fermentaciones resultaron elevados, por lo que el número de duplicaciones permitidas no fue mayor de tres y esto repercute en la forma de la línea que describe el crecimiento de la bacteria. Algunas sugerencias para aclarar este hecho se presentarán en el capítulo de perspectivas.

Adicionalmente se observó que cuando se utiliza fructosa, sacarosa e isomaltulosa como fuentes de carbono, se obtienen importantes niveles de actividad enzimática, lo que no sucede al emplear glucosa. En términos estructurales, el común denominador entre los azúcares con capacidad de inducción, es el residuo de fructosa, por lo que cabe la posibilidad de que el reconocimiento de un inductor de la actividad *ims* sea por el residuo fructosilo. Con el objeto de adquirir más herramientas que fortalezcan o no esta hipótesis, se realizó una fermentación con maltosa como fuente de carbono.

Es importante resaltar que para las subsecuentes fermentaciones, se utilizaron glicerolos crecidos en glucosa y con ellos se elaboró el preinóculo también en glucosa como fuente de carbono, de tal manera que al inicio de cada fermentación, la actividad estuviera cercana a cero y se podría apreciar de mejor forma el efecto **real** de cada azúcar sobre los niveles obtenidos de actividad *ims*.

5.3.6. Crecimiento de *P. rubrum* en maltosa.

En la **Figura 16** se aprecia el escaso crecimiento de la bacteria en maltosa. La curva de crecimiento asemeja mucho a la fermentación sin fuente de carbono. Durante las primeras 9 horas, la D.O. llegó a 4.1 y a las 24 horas aumentó a 7.8, sin embargo, las células se encontraban completamente lisadas. La cuantificación de maltosa reveló que la concentración de fuente de carbono permanece constante, lo que explica que la bacteria no haya crecido. El análisis por CCF

de la Figura 17 concuerda con lo anterior. El pH después de 24 horas fue de 6.55. Existe la posibilidad de que la maltosa no haya sido incorporada a la célula, lo cual explicaría el escaso crecimiento de la bacteria. Resulta entonces necesario utilizar otro u otros azúcares compuestos únicamente de glucosa o bien, únicamente de fructosa para poder confirmar esta hipótesis.

Se midió actividad al inicio de la fermentación, a las 8.5 y 24 horas y en ningún caso se obtuvo un resultado positivo. En consecuencia, es factible que el sitio de reconocimiento para inducir la producción de la enzima sea en el residuo de la fructosa de los azúcares utilizados hasta ahora, sin embargo sería importante confirmarlo mediante los experimentos propuestos.

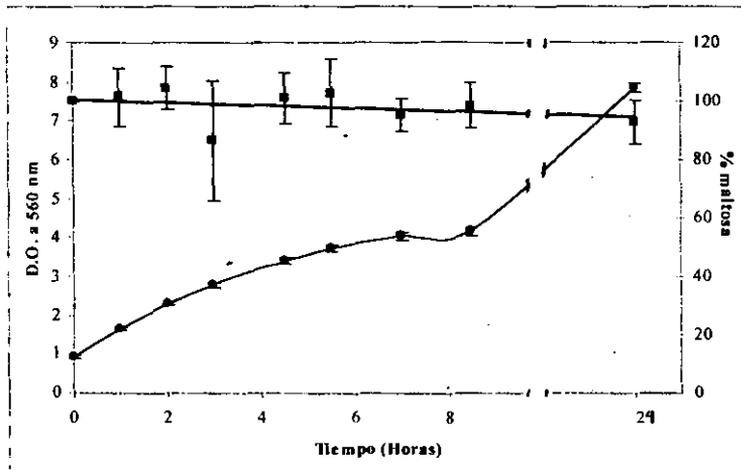


Figura 16. Cinética de crecimiento de *P. rubrum* en maltosa.
● D.O. a 560 nm; ■ % de maltosa.

1. ESTANDAR
2. ESTANDAR
3. MEDIO
4. TIEMPO= 0
5. T=1 HR
6. T=1 HR
7. T=2 HRS
8. T=3 HRS
9. T=4.5 HRS
10. T=5.5 HRS
11. T=7 HRS
12. T=8.5 HRS
13. T=24 HRS
14. ESTANDAR
15. ESTANDAR

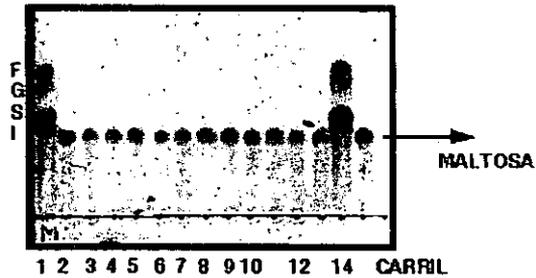


Figura 17. Cromatografía en capa fina de la fermentación de *P. rubrum* en maltosa. Se empleó una fase acetonitrilo:agua en relación 80:20. Se aplicó $1\mu\text{L}$ de cada muestra (sobrenadante del medio de cultivo) diluida previamente en relación 1:10.

5.3.7. Efecto de la preparación del preinóculo.

Se realizó nuevamente una fermentación utilizando fructosa como fuente de carbono. El preinóculo, como ya se mencionó, fue crecido en glucosa partiendo de un glicerol con glucosa, de tal forma que al inicio de la fermentación la actividad *ims* es muy baja. Como fue el caso en estos experimentos, la cinética que describe el crecimiento fue lineal, la fructosa se consumió por completo después de 9 horas. La actividad enzimática después de 4.5 horas aumentó a 3.8 ± 0.2 U/mg P y a las 8.5 horas fue de 4.0 ± 0.1 U/mg P.

Igualmente se realizó una nueva fermentación con sacarosa como fuente de carbono, de tal forma que no hubiese actividad *ims* al inicio. La cinética de crecimiento es la misma: tipo díauxica. La sacarosa se consume por completo en las primeras 3 horas y posteriormente utiliza como fuente de carbono la isomaltulosa producida hasta una desaparición total después de 10 horas. La actividad enzimática a las 4.5 horas de la fermentación resultó ser de 4.7 ± 0.4 U/mg P y a las 8.5 horas fue de 7.7 ± 0.7 U/mg P.

Analizando ambos resultados, se puede apreciar que a pesar de haber iniciado sin actividad, la presencia de fructosa y sacarosa induce nuevamente la producción de la enzima y se obtienen valores de actividad mayores a los observados anteriormente. Es posible que la glucosa ejerza represión catabólica y como consecuencia de ello, al cambiar de fuente de carbono, los niveles de actividad *ims* sean mayores.

5.3.8. Fermentaciones con sustratos combinados.

Se utilizaron mezclas de azúcares con la finalidad de profundizar tanto sobre el efecto inductor de los azúcares, así como obtener información acerca del sistema de transporte en cada caso, sobre lo cual no existe información en la literatura.

a) Crecimiento de *P. rubrum* en glucosa y fructosa.

Primeramente, se utilizó una mezcla equimolar de glucosa y fructosa como fuente de carbono. El preinóculo se creció en glucosa hasta llegar a la mitad de la fase de crecimiento y entonces se inoculó el medio con la mezcla de azúcares, iniciando así la fermentación.

La cinética de crecimiento fue prácticamente lineal durante 7 horas, después de las cuales, la pendiente cambia iniciándose la fase estacionaria. En la **Figura 18** se puede apreciar la cinética de consumo de azúcares, de donde se destaca la preferencia por glucosa, la cual es consumida durante las primeras 6 horas de crecimiento; una vez que la glucosa es agotada, la velocidad de consumo de fructosa se incrementa hasta que ésta se agota a las 9 horas. Los resultados muestran ausencia de actividad *ims* mientras los niveles de glucosa son elevados; sin embargo, una vez que la bacteria inicia el consumo de fructosa, se detecta 1.9 ± 0.2 U/mg P y aumenta conforme transcurre la fermentación. Al final de la fermentación, la actividad fue de 3.9 ± 0.2 U/mg P. Estos niveles de actividad que se obtienen, son semejantes a los que se observan en las fermentaciones donde se emplea únicamente fructosa como fuente de carbono. Es importante resaltar que aún habiendo actividad *ims* no se produce isomaltulosa a partir de glucosa y fructosa durante la fermentación, lo cual se constata en la **Figura 19**.

La secuencia en el consumo de azúcares es típica de una bacteria con un sistema de transporte del tipo PTS: se consume preferencialmente glucosa, que a su vez se encarga de bloquear los transportadores de otros azúcares, por ello, es necesario que se consuma la glucosa al menos parcialmente hasta que su efecto represor disminuye y sea posible transportar otros azúcares (Romano, 1986).

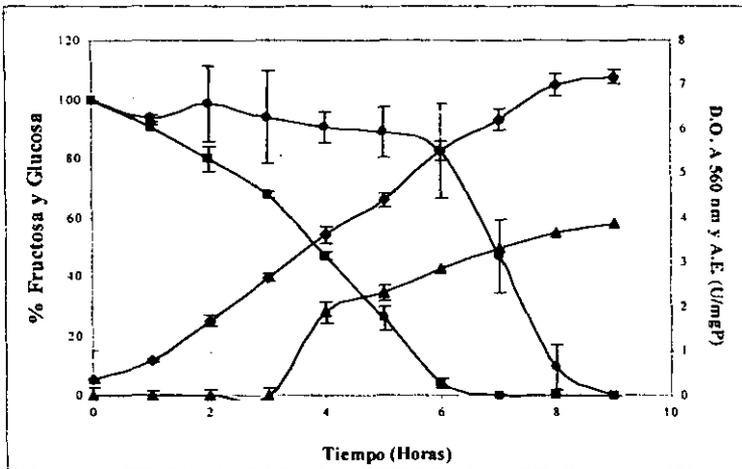


Figura 18. Cinética de crecimiento de *P. rubrum* en glucosa y fructosa al 1%. ◆ D.O. a 560 nm; ■ % de glucosa; ● % de fructosa; ▲ Actividad específica (U/mg P).

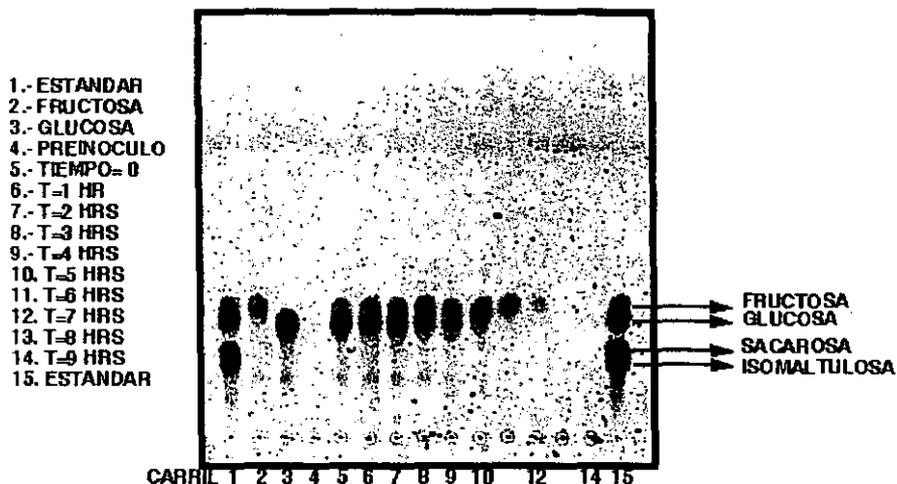


Figura 19. Cromatografía en capa fina de la fermentación de *P. rubrum* en glucosa y fructosa al 1%. Se empleó una fase acetonitrilo:agua en relación 80:20. Se aplicó 1 μ L de cada muestra (sobrenadante del medio de cultivo) diluida previamente en relación 1:10.

b) Crecimiento de *P. rubrum* en glucosa e isomaltulosa.

Se utilizó una mezcla equimolar de glucosa e isomaltulosa como fuente de carbono. La cinética de crecimiento fue similar a la fermentación anterior: lineal únicamente en las primeras 4 horas, posteriormente se desacelera y la pendiente de la curva cambia manteniendo un crecimiento lento de la hora 4 a la 9. En este punto se observa un ligero incremento para luego permanecer sin cambios hasta las 24 horas (Figura 20). La glucosa se consume preferencialmente y se agota a las 4.5 horas de fermentación. Posteriormente se aprecia un “período de adaptación” y es hasta las 6 horas cuando se inicia el consumo de isomaltulosa, que como se constató con anterioridad, es muy lento. Aún después de 24 horas, la isomaltulosa no ha sido consumida por completo (Figura 21). El pH final de la fermentación fue de 6.28.

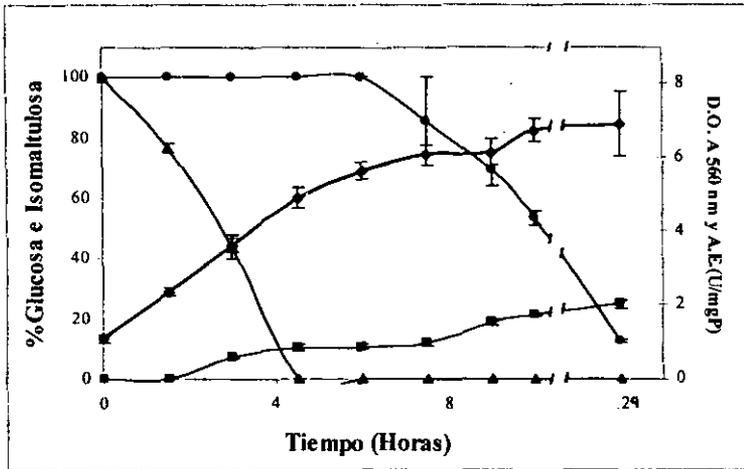


Figura 20. Cinética de crecimiento de *P. rubrum* en glucosa 1% e isomaltulosa 1.9%. ◆ D.O. a 560 nm; ▲ % de glucosa; ● % de isomaltulosa; ■ Actividad específica (U/mg P).

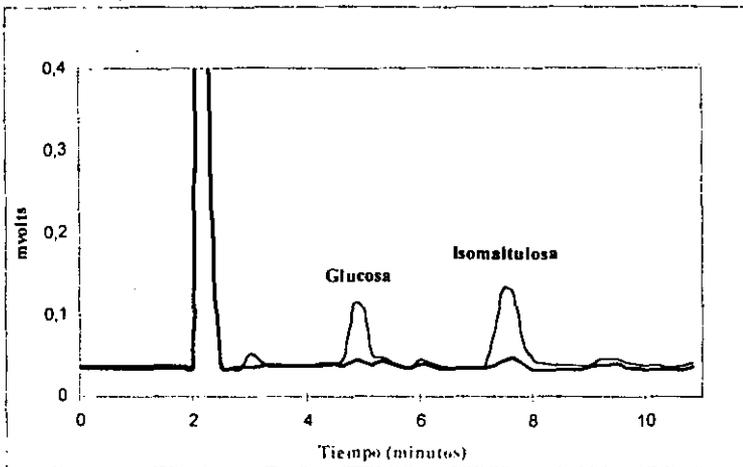


Figura 21. Cromatograma de la fermentación con glucosa 1% e isomaltulosa 1.9%. El tiempo de corrida de la muestra fue de 10.5 minutos; la fase móvil empleada fue acetonitrilo:agua en relación 80:20. — Cero horas; - - 24 horas

La actividad enzimática se detecta hasta transcurridas 3 horas de la fermentación (0.6 ± 0.05 U/mg P) y aumenta ligeramente a lo largo de la misma hasta llegar a 2.03 ± 0.1 U/mg P. En este caso, los niveles de actividad obtenidos son inferiores a los que se observan en la fermentación con isomaltulosa como única fuente de carbono; es posible que la presencia de glucosa bloquee el sistema de transporte de la isomaltulosa al interior de la célula y aún después de ser consumida, el proceso de readaptación del microorganismo continúa lentamente. De igual forma, es posible que se trate además de un efecto de represión catabólica de la glucosa.

En cuanto al transporte de azúcares, estos resultados demuestran también un sistema PTS jerarquizado.

c) Crecimiento de *P. rubrum* en glucosa y sacarosa.

También en este caso, la mezcla de carbohidratos empleada fue equimolar. A diferencia de las fermentaciones anteriores y contrario a lo que pudiera esperarse, el consumo de azúcares no fue secuencial. En la **Figura 22** se ilustra la cinética de crecimiento: la sacarosa fue convertida rápidamente en isomaltulosa dentro de las primeras 4 horas de la fermentación; casi simultáneamente la glucosa fue consumida como fuente de carbono y se agotó a las 6 horas. Este fue uno de los escasos experimentos en los que se observó una cinética de crecimiento exponencial, particularmente durante el consumo de glucosa, para después desacelerarse al iniciar el consumo de isomaltulosa, el crecimiento aumenta nuevamente formándose una curva diáuxica. La isomaltulosa producida durante esta etapa, es consumida por completo al llegar a las 12 horas de fermentación. La **Figura 23** complementa la evolución de la fermentación. De estos resultados, se pueden suponer algunos eventos:

- ♦ Si la bacteria efectivamente posee un sistema de transporte del tipo PTS para glucosa, entonces el transporte de sacarosa estaría desacoplado a éste. Este es el caso, dado que el consumo de ambos azúcares ocurre casi simultáneamente y además no se observa un “bloqueo” en el transporte de sacarosa en presencia de glucosa.

- ◆ El consumo de isomaltulosa sucede más rápido que si se utiliza una mezcla de glucosa + isomaltulosa como fuente de carbono; esto hace pensar que la presencia de sacarosa induce no solamente la producción de la enzima *ims*, sino el mecanismo para el transporte y catabolismo de isomaltulosa. Posiblemente por ello la isomaltulosa producida durante la fermentación a partir de sacarosa, se consume con mayor facilidad y no existe una “fase de adaptación”.

Evidentemente, la actividad enzimática se detecta desde la primera hora llegando a un máximo de 3.3 ± 0.1 U/mg·P a las 4.5 horas de fermentación (cuando se termina la sacarosa) y se mantiene casi constante el resto del tiempo. Al final de la fermentación, la actividad fue de 3.8 ± 0.2 U/mg P y el pH de 6.05.

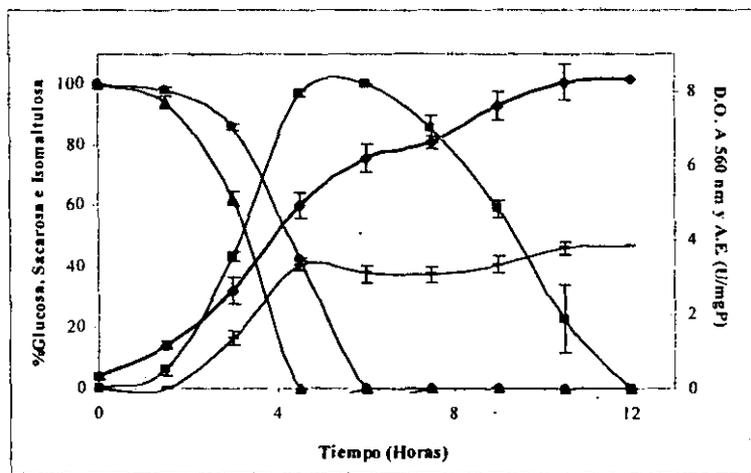


Figura 22. Cinética de crecimiento de *P. rubrum* en glucosa 1% y sacarosa 1.9%. ◆ D.O. a 560 nm; ▲ % de sacarosa; ● glucosa; ■ % de isomaltulosa; ■ Actividad específica (U/mg P).

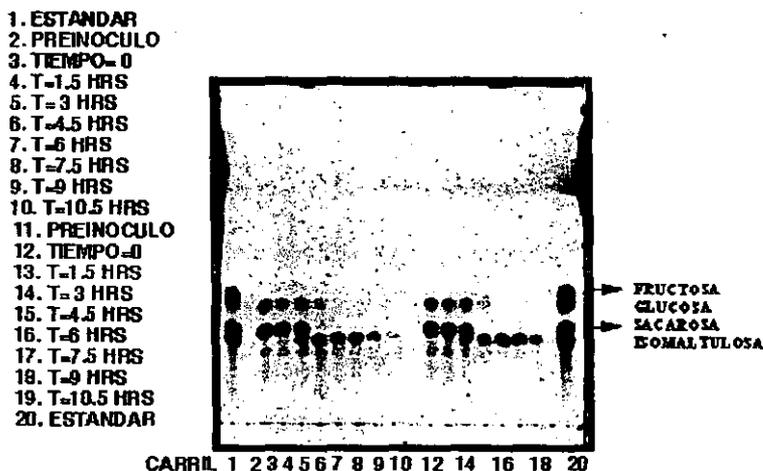


Figura 23. Cromatografía en capa fina de la fermentación de *P. rubrum* en glucosa 1% y sacarosa al 1.9%. Se empleó una fase acetonitrilo:agua en relación 80:20. Se aplicó 1 μ L de cada muestra diluida previamente en relación 1:10. Los carriles 3 al 10 son muestras de los sobrenadantes del medio de cultivo a diferentes tiempos de fermentación. Los carriles 12 al 19 son duplicados de las mismas muestras.

5.3.9. Análisis comparativo de los niveles de actividad *ims* con diferentes fuentes de carbono.

Se realizó una comparación en cuanto a los niveles de actividad utilizando las diferentes fuentes de carbono ya estudiadas y otras mas, utilizando la misma concentración molar (55mM) y midiendo la actividad producida después de 4.5 horas de crecimiento. Las fuentes de carbono adicionales fueron: maltosa, xilosa y glicerol; al seguir la cinética de crecimiento, resultó claro que la bacteria no consumió estos sustratos como fuente de carbono y/o energía, pues la concentración de los mismos no varió durante el proceso, ni se detectó actividad *ims*. Los resultados se presentan en la Tabla IX.

Tabla IX. Crecimiento de *P. rubrum* en diferentes fuentes de carbono y actividad *ims* obtenida*.

Fuente de Carbono	D.O. a 560 nm	Actividad específica (U/mg P)
Isomaltulosa	3.9 ± 0.2	4.6 ± 0.1
Sacarosa	4.9 ± 0.1	3.2 ± 0.07
Fructosa	4.9 ± 0.3	2.5 ± 0.03
Glucosa	5.8 ± 0.3	0.7 ± 0.02
Glucosa + Fructosa	3.6 ± 0.2	1.9 ± 0.2
Glucosa + Sacarosa	4.9 ± 0.3	3.3 ± 0.1
Glucosa + Isomaltulosa	4.9 ± 0.3	0.8 ± 0.08

*Después de 4.5 horas de crecimiento.

Como ya se había mencionado, los niveles de actividad mas elevados, se obtienen con la isomaltulosa (el producto de la reacción catalizada por la *ims*) seguida de la sacarosa (el sustrato e inductor habitual) y la fructosa. En presencia de glucosa, los niveles de actividad *ims* son del 15% con respecto al valor máximo obtenido. La maltosa, xilosa y glicerol no son utilizados por la bacteria como fuente de carbono y por ende tampoco se obtiene actividad. Las mezclas de carbohidratos no reditúan en un incremento significativo de la actividad enzimática. Únicamente en la fermentación con glucosa + sacarosa sí existe un nivel comparable con el máximo obtenido (75%). Es evidente que el empleo de isomaltulosa como fuente de carbono no resulta viable en términos económicos si se desea obtener una enzima con actividad *ims*, por lo que lo más conveniente sería utilizar a la sacarosa como fuente de carbono e inductor de la actividad utilizando un preinóculo de glucosa que redundaría en un mayor nivel de actividad enzimática respecto a los obtenidos anteriormente (Tinoco, 1997).

Recientemente, Huang y cols. (1998) aislaron varias cepas que clasificaron como *Klebsiellas* y que producen células con alta capacidad de producir isomaltulosa. Realizaron una optimización del medio de cultivo y encontraron que la fructosa y la sacarosa resultaron ser las mejores fuentes de carbono para el crecimiento de esta bacteria. De igual forma, midieron la actividad enzimática obtenida de las células crecidas en diferentes fuentes de carbono y a diferencia de *P. rubrum*, *Klebsiella* produce más actividad con fructosa que con sacarosa e isomaltulosa y al utilizar maltosa como fuente de carbono, sí detectan actividad *ims*. Lo anterior hace suponer que existen algunas diferencias entre los mecanismos de inducción de la actividad entre las bacterias, al igual que su respuesta ante distintas fuentes de carbono.

5.4. Fermentación en dos etapas.

Como resultado de la experiencia adquirida en los experimentos anteriores, se diseñó una nueva estrategia de fermentación bajo limitación de nutrientes, con el objeto de forzar a que la bacteria utilizara dentro de una primera etapa la sacarosa presente para producir isomaltulosa, la cual sería empleada en una segunda etapa como fuente de carbono y energía junto con los nutrientes restantes del medio de cultivo convencional. Debido a que la isomaltulosa resultó ser el mejor inductor, se implementó esta estrategia con el objetivo de incrementar la actividad *ims* respecto a los valores obtenidos en las fermentaciones anteriores. En la **Figura 24** se presenta la evolución de esta primera etapa de la fermentación, en donde las células viables en un medio de cultivo limitado actúan sobre la sacarosa para lograr su conversión total a isomaltulosa después de 2 horas de incubación. Posteriormente se adicionaron los nutrientes faltantes, de tal forma que la bacteria consumió la isomaltulosa y se observa una cinética de crecimiento lineal durante las siguientes 9 horas, al cabo de las cuales, la pendiente cambia iniciándose la fase estacionaria. En la **Figura 25** se aprecia que la isomaltulosa es consumida completamente al cabo de 10.5 horas. Al inicio de la segunda etapa de la fermentación la actividad fue de 2.5 ± 0.07 U/mg P y fue aumentando hasta lograr un máximo de 4.7 ± 0.3 U/mg P al final de la fermentación.

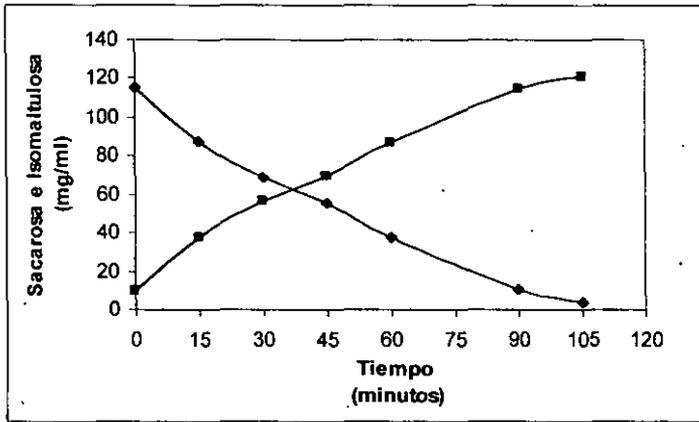


Figura 24. 1ª. Parte de la fermentación: conversión de sacarosa a isomaltulosa. ◆ mg/mL de sacarosa; ■ mg/mL de isomaltulosa

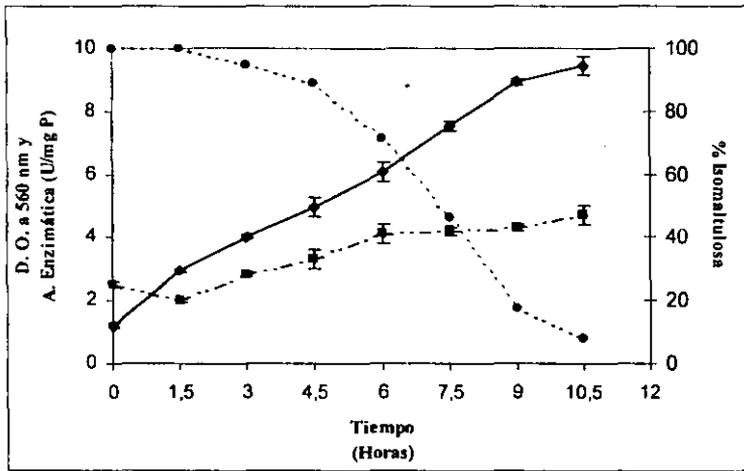


Figura 25. 2ª. Parte de la fermentación: Crecimiento de *P. rubrum* en isomaltulosa. ◆ D.O. a 560 nm; ● % de isomaltulosa; ■ Actividad específica (U/mg P)

A manera de resumen, en la **Tabla X** se presentan los valores de actividad *ims* obtenidos en las diferentes estrategias de fermentación utilizadas durante el desarrollo de este trabajo.

Tabla X. Resumen de la actividad *ims* obtenida con diferentes estrategias de fermentación.

Tipo de fermentación	Actividad (U/mg P)
Sacarosa (1)	1.8 ± 0.2
Sacarosa (2)	3.16 ± 0.07
Isomaltulosa	4.56 ± 0.14
Sacarosa (2 etapas)	4.1 ± 0.3

(1) Preinóculo con sacarosa. (2) Preinóculo con glucosa.

5.5. Estudio cinético.

En el **Apéndice 1**, se presenta un resumen gráfico del estudio cinético realizado al crecer *P. rubrum* en diferentes fuentes de carbono. De manera general se puede apreciar que la cinética de crecimiento de la bacteria no fue logarítmico, sino lineal y esto se puede constatar al analizar las gráficas de la velocidad de crecimiento (R_x) y consumo de sustrato (R_s) contra el tiempo; o bien, de la velocidad específica de crecimiento (q_x) y consumo de sustrato (q_s) contra el tiempo, para cada caso.

En prácticamente todos los casos se obtuvo una cinética lineal (glucosa, fructosa, isomaltulosa, glucosa + isomaltulosa y glucosa + fructosa), por lo que no es de extrañar que se observe un valor casi constante de R_x en función del tiempo (**Apéndice 1**). La velocidad de consumo de sustrato sigue la misma tendencia que la R_x en cada fermentación. Cuando se utiliza una mezcla de azúcares, se observan claramente dos etapas en la velocidad de crecimiento, cada una corresponde al crecimiento con un azúcar de manera independiente; en la velocidad de consumo de sustrato, se obtienen también dos curvas diferentes en donde el máximo para la glucosa ocurre en las primeras horas y el máximo para fructosa o isomaltulosa se presenta cuando la glucosa se ha agotado. La excepción es el caso de la glucosa y sacarosa, en donde la asimilación de estos azúcares es simultánea, y sus R_s son iguales; adicionalmente, la R_x se comporta como es frecuente (primer orden).

Como consecuencia de lo anterior, en las gráficas no se observa el comportamiento usual en la velocidad específica de crecimiento (μ), es decir, no permanece constante durante un período amplio de tiempo (generalmente μ_{max}); esto puede deberse a que los inóculos fueron muy altos. En todos los casos, la q_x y las diferentes q_s 's son altas al inicio y conforme transcurre el tiempo, disminuye rápidamente.

En la **Tabla XI** se condensan los resultados del estudio cinético. Primeramente se obtuvo una constante de crecimiento de primer orden (μ), resultado de graficar $\ln X$ vs t pero únicamente durante las primeras horas de fermentación, puesto que como ya se mencionó, la cinética no es logarítmica. Para el caso de glucosa, fructosa y sacarosa el valor es muy similar, no así para la isomaltulosa, donde se observan los valores de μ más bajos; sobre todo en los casos en los que ésta no se obtiene de la sacarosa. Para las fermentaciones mixtas con glucosa + fructosa ó glucosa + isomaltulosa, la velocidad es equiparable con la del crecimiento con isomaltulosa como única fuente de carbono. El valor más alto de μ fue para glucosa + sacarosa: 0.67.

Considerando que los coeficientes de correlación de estas gráficas no son satisfactorios y que se observa una cinética lineal en la mayoría de los casos, se decidió obtener una constante de crecimiento de orden cero (K) que nos permitiese comparar mas claramente el comportamiento de la bacteria en cada uno de los azúcares estudiados.

Sabiendo que $dx/dt = \mu$ se integra la ecuación y se obtiene que $X = X_0 + Kt$

De esta manera, se obtuvo una K muy semejante para glucosa, fructosa y sacarosa; nuevamente menor para isomaltulosa y dos o tres veces mayor cuando se consume glucosa y fructosa en las fermentaciones mixtas; la K del consumo de isomaltulosa aún en la fermentación mixta, resulta muy baja (0.16). Sin embargo, la K durante el crecimiento de *P. rubrum* en glucosa + sacarosa es cuatro veces mayor que con glucosa, fructosa y sacarosa. Los valores de K también se reportan en la **Tabla XI**.

Tabla XI. Resumen del estudio cinético de *P. rubrum* frente a diferentes fuentes de carbono.

Fuente de carbono	μ^* (horas ⁻¹)	K promedio (mg cel/ mL*hr)	Actividad Enzimática máxima (U/mg P)
Glucosa	0.49	0.326	0.93
Fructosa	0.52	0.332	3.11
Sacarosa	S	0.48	4.24
	I	0.11	
Isomaltulosa	0.34	0.204	5.23
Glucosa + Fructosa	G F	0.31	3.89
		0.24	
Glucosa + Isomaltulosa	G I	0.24	2.03
		0.04	
Glucosa + Sacarosa	G S	0.67	3.78
		0.67	
	I	0.06	

* Valor de μ al inicio de la fermentación o durante el consumo del azúcar señalado.

Respecto a la actividad enzimática obtenida, no fue posible correlacionar la μ o K a este parámetro, ya que se observa por ejemplo, en el caso de glucosa (que posee la misma K y μ que el crecimiento con fructosa y sacarosa), que la actividad es menor a los otros sustratos y contrariamente un bajo valor de K y μ como la del crecimiento en isomaltulosa, corresponde a la mayor actividad enzimática. Los niveles de actividad de las fermentaciones mixtas, son intermedios.

5.6. Reacciones con diferentes sustratos.

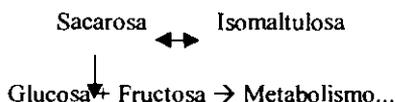
El mecanismo de reacción que lleva a cabo la enzima *ims*, así como las vías metabólicas de la bacteria, son aún desconocidas. Del primer punto, existen unas cuantas hipótesis (Cheetham, 1984; Kakinuma 1994, 96, 98), pero nada en concreto. Del segundo tema, no existe información alguna en la literatura. Es por ello que resulta interesante explorar este campo y generar conocimiento al respecto.

En este sentido, se ensayaron reacciones enzimáticas utilizando sustratos diferentes a la sacarosa. Por un lado, isomaltulosa: para indagar sobre una posible reversibilidad de isomaltulosa a sacarosa y por otro, fructosa: con el objeto de conocer si la enzima era capaz de llevar a cabo una isomerización de fructosa a glucosa. Como se puede apreciar en la **Figura 26**, la isomaltulosa permaneció sin cambio al cabo de 24 horas de reacción bajo diferentes condiciones de pH; no se observa formación de sacarosa ni hidrólisis de isomaltulosa, lo cual, indica que la *ims* no lleva a cabo la reacción en sentido inverso y por lo tanto su asimilación tendría que darse de la siguiente manera:

?

Sacarosa → Isomaltulosa → Asimilación de isomaltulosa → Glucosa + Fructosa → Metabolismo...

y no de una hidrólisis de sacarosa al ser reversible la reacción:



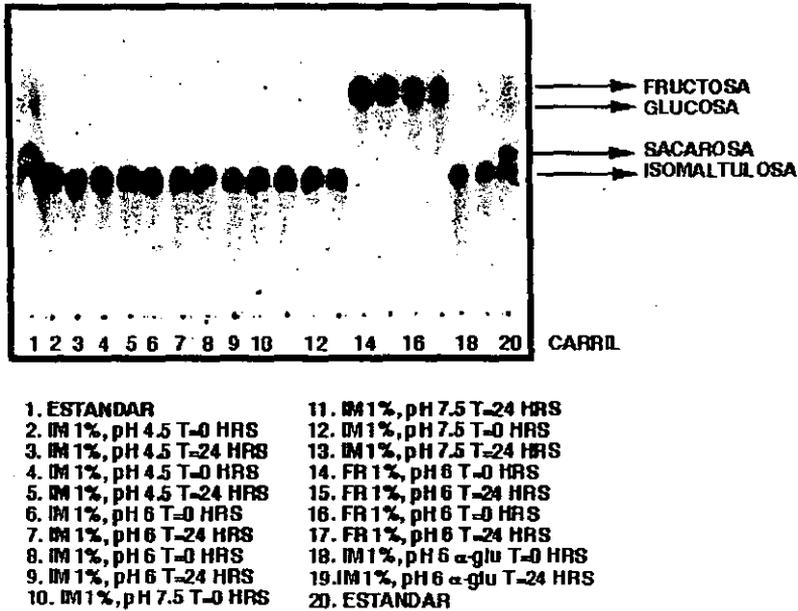


Figura 26. Cromatografía en capa fina de las reacciones de la *ims* frente a diversos sustratos. Se empleó una fase acetonitrilo:agua en relación 80:20. Se aplicó 1 μ L de cada muestra diluida previamente en relación 1:2. Cada reacción se realizó por duplicado, el cual se ilustra en la figura.

Por otro lado, se observa también que la fructosa no fue isomerizada a glucosa, permaneció sin cambio al cabo de 24 horas de reacción. En un estudio previo (Tinoco, 1997), se utilizó una mezcla de fructooligosacáridos como sustrato de la enzima, sin que tampoco se observara transformación alguna después de 24 horas.

Finalmente se utilizaron glucosa y fructosa libres como sustrato, con el objeto de conocer si la enzima era capaz de producir isomaltulosa a partir de estos monosacáridos. En la **Figura 27** se puede apreciar el cromatograma de la reacción a las cero y 24 horas: tanto la cantidad de glucosa como fructosa permanecen constantes y no se observa formación de isomaltulosa. Por lo anterior, se concluye que la *ims* no es capaz de reconocer a la glucosa y fructosa como sustratos, únicamente los utiliza cuando provienen de la sacarosa. Este mismo hecho fue observado anteriormente en la enzima de *E. rhapontici* y que reportó Cheetham en 1984.

De estos resultados, parece ser que esta enzima es específica en cuanto al sustrato que transforma, no así para los aceptores a los cuales transfiere el residuo de glucosa, tal y como se reportó anteriormente (Tinoco, 1997).

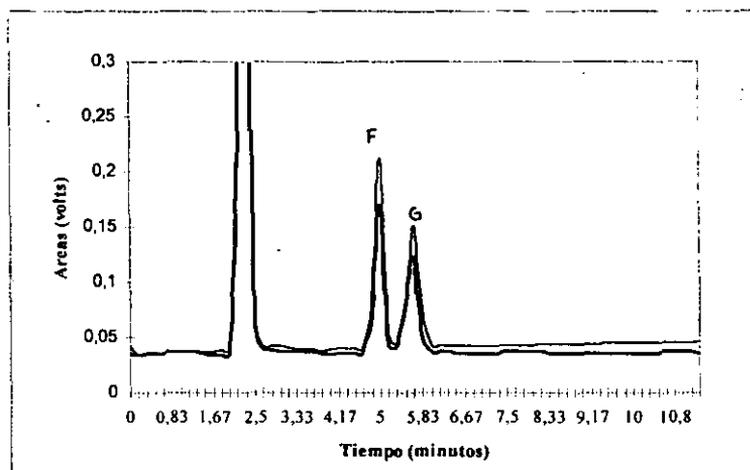


Figura 27. Cromatograma de la reacción utilizando glucosa y fructosa como sustratos, para la síntesis de isomaltulosa. El tiempo de corrida de la muestra fue de 11 minutos; la fase móvil empleada fue acetonitrilo:agua en relación 80:20. — Cero horas; — 24 horas

VI. CONCLUSIONES

- El medio de cultivo implementado a partir de las referencias bibliográficas no resultó adecuado para el crecimiento del microorganismo ni para la obtención de la actividad *ims*.
- El mayor nivel de actividad *ims* se obtuvo al crecer a la bacteria en presencia de isomaltulosa.
- En presencia de glucosa, los niveles de actividad *ims* observados resultaron bajos: apenas del 15% respecto con el de la isomaltulosa.
- Con sacarosa y fructosa se logró un buen crecimiento del microorganismo y niveles de actividad de 70% y 54% respecto al mayor.
- La maltosa, xilosa y glicerol no son utilizados por la bacteria como fuente de carbono y energía, ni tampoco inducen la producción de la enzima.
- La presencia de fructosa y sacarosa después de un crecimiento en glucosa, favorece nuevamente la producción de la enzima y se obtienen niveles de actividad mayores a los observados cuando se utiliza únicamente fructosa y sacarosa como fuente de carbono sin un crecimiento previo en glucosa.
- La secuencia observada en el consumo de glucosa mas fructosa dentro de una fermentación mixta, representa un patrón típico de una bacteria con un sistema de transporte del tipo PTS.
- Para el crecimiento con glucosa mas isomaltulosa se presume el mismo sistema de transporte, sin embargo el consumo del segundo azúcar ocurre a una mucho menor velocidad.
- Por el contrario, en una combinación de glucosa mas sacarosa, el consumo de los azúcares ocurre simultáneamente, por lo que no es factible que se utilice el mismo sistema de transporte.

- La nueva estrategia de fermentación en dos etapas permitió aumentar los niveles de actividad hasta en un 100% respecto a los obtenidos en las fermentaciones anteriores.

Respecto a las reacciones con diferentes sustratos, es posible concluir que la enzima no es capaz de:

- ❖ Catalizar la reacción en sentido inverso.
- ❖ Isomerizar fructosa en glucosa.
- ❖ Sintetizar isomaltulosa a partir de monómeros de glucosa y fructosa.

VII. PERSPECTIVAS

- ❖ Estudiar el crecimiento de la bacteria utilizando como fuente de carbono un compuesto formado únicamente de monómeros de fructosa, con el objeto de confirmar si el reconocimiento del azúcar para estimular la actividad *ims* ocurre en el residuo fructosilo de la molécula.
- ❖ Como una alternativa que ayudara a confirmar el hecho anteriormente mencionado, utilizar un azúcar formado únicamente de monómeros de glucosa, diferente a la maltosa y que sea asimilado por la bacteria.
- ❖ Estudiar el crecimiento de *P. rubrum* y la actividad *ims* obtenida bajo condiciones controladas de pH y agitación.
- ❖ Realizar fermentaciones con una concentración menor de inóculo con el objeto de estudiar finamente las cinéticas de crecimiento de la bacteria.
- ❖ Iniciar estudios a nivel molecular para que junto con la experiencia ya generada sea posible definir un mecanismo de inducción de la actividad *ims*.
- ❖ Complementar el presente trabajo con estudios de biología molecular, para lograr la clonación y secuenciación del gene que produce la *ims* y su posterior caracterización molecular.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- ❖ AUSTIN, B. AND GOODFELLOW, M. Pseudomonas mesophilica, a new species of pink bacteria isolated from leaf surfaces. *Int. J. of Syst. Bacteriol.* Vol. 29. No.4. (1979). p.p. 373-378.
- ❖ BAILEY, R. W. AND BOURNE, E.J. *Nature* (London). Vol. 194. (1959). p.p. 904 y 905.
- ❖ BALOWS, A., TRÜPER, H.G., DWORKIN, M., HARDER, W. AND SCHLEIFER, K.H. The Procarvates. 2nd Ed. Ed. Springer-Verlag. Vol. III. Varios Capítulos. USA. 1991.
- ❖ BARRY, R.D. Outlook for Sugar and Sweeteners. ERS, USDA, 1987.
- ❖ BERGEY, D.H., HARRISON, F.C., BREED, R.S., HAMMER, B.W., and HUNTOON, F.M. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Ed. The Williams and Wilkins Co. Baltimore, USA, 1999. <http://www.cme.msu.edu/bergeys/index.html>
- ❖ BIRKHED, D., KALFAS, S., SVENSÅTER, G. AND EDWARDSSON, S. Microbiological aspects of some caloric sugar substitutes. *Int. Dent. J.* Vol. 35. (1985). p.p. 9-17.
- ❖ BOURNE, E.J., HUTSON D.H. AND WEIGEL, H. Oligosaccharides in dextran-producing cultures of Streptococcus bovis. *Biochem. J.* Vol. 79. (1961). p.p. 549-553.
- ❖ BOUSFIELD, I.J. AND GREEN, P.N. Reclassification of bacteria of the genus Protomonas Urakami and Komogata 1984 in the genus Methylobacterium (Patt, Cole, and Hanson) Emend. Green and Bousfield 1983. *Int. J. of Syst. Bacteriol.* Vol. 35. No. 2. (1985). p.p. 209.
- ❖ BUCKE, C. Oligosaccharide synthesis using glycosidases. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* Vol. 67. (1996). p.p. 217-220.
- ❖ CHEETHAM, P.S.J. The extraction and mechanism of a novel isomaltulose-synthesizing enzyme from Erwinia rhapontici. *Biochem. J.* Vol. 220. (1984). p.p. 213-220.
- ❖ CHEETHAM, P.S.J. Production of isomaltulose using immobilized microbial cells. *Meth Enzym.* Vol. 136. (1987). p.p. 432-454.
- ❖ CHEETHAM, P.S.J., GARRET, C., CLARK, J., Isomaltulose production using immobilized cells. *Biotech Bioeng.* Vol. XXVII. (1985). p.p. 471-481.
- ❖ CHEETHAM, P.S.J., IMBER, C.E. AND ISHERWOOD, J. The formation of isomaltulose by immobilized Erwinia rhapontici. *Nature.* Vol. 299. (1982). p.p. 628-631.
- ❖ COLLINS, P.M., Carbohydrates. Ed. Chapman and Hall Chemistry Sourcebooks. London, U.K., 1987. p.p. 293.

- ❖ COONEY, C. L. Growth of microorganisms. In: Biotechnology, a comprehensive treatise. Vol. 1. Eds. H. J. Rhem and G. Reed. Ed. Verlag Chemie, Weingem, Deerfield, U.S. 1981. p.p. 73-112.
- ❖ DAHLQVIST, A. AURICCHIO, S., SEMENZA, G. AND PRADER, A. Human intestinal disaccharidases and hereditary disaccharide intolerance. The hydrolysis of sucrose, isomaltose, palatinose (isomaltulose), and a 1,6- α -oligosaccharide (isomalto-oligosaccharide) preparation. *J. Clin. Invest.* Vol. 42. No. 4. (1963). p.p. 556-562.
- ❖ DE VRIES, J.T. AND DERX, M.G. An occurrence of *Mycoplana rubra* and its identity with *Protaminobacter ruber*. *Ann. Bogor.* Vol. 1. (1953). p.p. 50-53.
- ❖ DIXON, M. AND WEBB, E. C. Enzymes. Ed. Longman. U.K. 1999. <http://expasy.cbr.nrc.ca/enzyme>.
- ❖ DOMINGUEZ, H. AND LINDLEY, N.D. Complete sucrose metabolism requires fructose phosphotransferase activity in Corynebacterium glutamicum to ensure phosphorylation of liberated fructose. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 62. No. 10. (1996). p.p. 3878-3880.
- ❖ EDGAR, W.M. AND DODDS, M.W.J. The effect of sweeteners on acid production in plaque. *Int. Dent. J.* Vol. 35. (1985). p.p. 18-22.
- ❖ FUJII, S., KISHIHARA, S., KOMOTO, M. AND SHIMIZU, J. Isolation and characterization of oligosaccharides produced from sucrose by transglucosylation action of Serratia plymuthica. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi.* Vol. 30. No. 6. (1983). p.p. 339-344.
- ❖ FUJII, S., YOSHINAGA, K. KISHIHARA, S. AND KOMOTO, M. Oligosaccharides produced by transglucosidation action of Protaminobacter rubrum α -glucosidase. *Proc. Res. Soc. Jpn. Sugar Refin. Tech.* Vol. 34. (1985) p.p. 37-44.
- ❖ GALAND, G. First purification and characterization of a sucrase-isomaltase from goose kidney microvillous membrane. *Biochim. Biophys. Acta.* Vol. 1033. (1990). p.p. 35-40.
- ❖ GHERNA, R., PIENTA, P. AND COTE, R. ATCC. Catalogue of Bacteria and Bacteriophages. Ed. American Type Culture Collection. USA. 1999. <http://www.atcc.org>.
- ❖ GODA, T. AND HOSOYA, N. Hydrolysis of palatinose by rat intestinal sucrase-isomaltase complex. *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.* Vol. 36. (1983). p.p. 169-173.
- ❖ GOUFFI, K., PICA, N., PICHEREAU, V. AND BLANCO, C. Disaccharides as a new class of nonaccumulated osmoprotectants for Sinorhizobium meliloti. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 65. No. 4. (1999). p.p. 1491-1500.
- ❖ GREEN, P.N. AND BOUSFIELD, I.J. A Taxonomic study of some gram-negative facultatively methylotrophic bacteria. *J. of Gen. Microbiol.* Vol. 128. (1982). p.p. 623-638.

- ❖ GREEN, P.N. AND BOUSFIELD, I.J. Emendation of *Methylobacterium* Patt, Cole, and Hanson 1976; *Methylobacterium rhodinum* (Heumann 1962) comb. Nov. Corrig.; *Methylobacterium radiotolerans* (Ito and Iizuka 1971) com. Nov. Corrig.; and *Methylobacterium mesophilicum* (Austin and Goodfellow 1979) comb. nov. *Int. J. of Syst. Bacteriol.* Vol. 33. No. 4. (1983). p.p. 875-877.
- ❖ GREEN, P.N., BOUSFIELD, I.J. AND HOOD, D. Three new *Methylobacterium* species: *M. rhodesianum* sp. nov., *M. zatmanii* sp. nov. and *M. fujisawaense* sp. nov. *Int. J. of Syst. Bacteriol.* Vol. 38. No. 1 (1988). p.p. 124-127.
- ❖ HALL, B.G. Transgalactosylation activity of ebg β -galactosidase synthesizes allolactose from lactose. *J. Bacteriol.* Vol. 150. No. 1. (1982). p.p. 132-140.
- ❖ HALVORSEN, H. *Methods in Enzymol.* Vol. 8. (1966). p.p. 559-562.
- ❖ HAN, E.K., COTTY, F., SOTTAS, C. JIANG, H. AND MICHELS, C.A. Characterization of AGT1 encoding a general α -glucoside transporter from *Saccharomyces*. *Mol. Microbiol.* Vol. 17. No. 6. (1995). p.p. 1093-1107.
- ❖ HAYANO, K. AND FUKUI, S. Purification and properties of 3-ketosucrose-forming enzyme from the cells of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Biol. Chem.* Vol. 242. No. 17. (1967). p.p. 3665-3672.
- ❖ HEHRE, E.J. Enzymatic synthesis of polysaccharides: a biological type of polymerization. *Adv. Enzymol. Relat. Subj. Biochem.* Vol. 11. (1951): p.p. 297-330.
- ❖ HEUMANN, W. Die methodik der kreuzung sternbildner bakterien. *Biologisches Zentralblatt.* Vol. 81. (1962). p.p. 341-354.
- ❖ HEYMANN, H., BREITMEIER, D. AND GÜNTHER, S. Human small intestinal sucrase-isomaltase: different binding patterns for malto- and isomaltooligosaccharides. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler.* Vol. 376. (1995). p.p. 249-253.
- ❖ HUANG, J.H., HSU, L.H., AND SU, Y.C. Conversion of sucrose to isomaltulose by *Klebsiella planticola* CCRC-19112. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* Vol. 21. No. 1/2. (1998). p.p. 22-27.
- ❖ IRWIN, W.E. Isomalt- A sweet, reduced-calorie bulking agent. *Food Tech. [I.F.T.]* Vol. 44. No. 6. (1990). p.p. 128.
- ❖ ITO, H. AND IIZUKA. Taxonomic studies on a radio resistant *Pseudomonas XII*. Studies on the microorganisms or cereal grains. *Agric. Biol. Chem.* Vol. 35. (1971). p.p. 1566-1571.
- ❖ JACOBSSON, S., JAMISON, A. AND ROTHMAN, H. The biotechnological Challenge. Cambridge University Press. N.Y., U.S.A., 1986.
- ❖ JOSEPH S.B.F., DEKKER, M. Inc. N.Y. AND BASEL, R. Thin Layer Chromatography Techniques and Appl. 2nd. Edit. Ed. DEKKER, Inc. New York, U.S.A. 1986. Cap. 17. p. 287.

- ❖ KAWAI, K., OKUDA, Y. AND YAMASHITA, K. Changes in blood glucose and insulin after an oral palatinose administration in normal subjects. *Endocrinol. Japon.* Vol. 32. No. 6. (1985). p.p. 933-936.
- ❖ KAKINUMA, H., TSUCHIYA, Y., TANAKA, M., HORITO, S. AND HASHIMOTO, H. Transglucosylation with 6'-chloro-6'-deoxysucrose and immobilized isomaltulose-producing microorganisms using 2,2-dimethyl-1,3-dioxolane-4-methanol and its related compounds as acceptors. Steric and chemical requirement of the glucosyl acceptor. *Carbohydr. Res.* Vol. 264. (1994). p.p. 237-251.
- ❖ KAKINUMA, H., YUASA, H. AND HASHIMOTO, H. Synthesis of 1',6'-disubstituted sucroses and their behavior as glucosyl donors for a microbial α -glucosyltransferase. *Carbohydr. Res.* Vol. 264. (1996). p.p. 61-72.
- ❖ KAKINUMA, H., YUASA, H. AND HASHIMOTO, H. Glycosyltransfer mechanism of α -glucosyltransferase from Protaminobacter rubrum. *Carbohydr. Res.* Vol. 312. (1998). p.p. 103-115.
- ❖ KAWAI, K., OKUDA, Y., CHIBA, Y. AND YAMASHITA, K. Palatinose as a potential parenteral nutrient: Its metabolic effects and fate after oral and intravenous administration to dogs. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* Vol. 32. (1986). p.p. 297-306.
- ❖ KAWAI, K., YOSHIKAWA, H., MURAYAMA, Y., OKUDA, Y. AND YAMASHITA, K. Usefulness of palatinose as a caloric sweetener for diabetic patients. *Horm. Metabol. Res.* Vol. 21. (1989). p.p. 338-340.
- ❖ KOUNO, K. AND OZAKI, A. Growth on C₁-compounds. *Proc. Int. Symp. Microbiol.* (1975). p.p. 11.
- ❖ LENGELER, J.W., MAYER, R.J. AND SCHMID. Phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system enzyme III and plasmid-encoded sucrose transport in Escherichia coli K-12. *J. Bacteriol.* Vol. 151. No. 1. (1982). p.p. 468-471.
- ❖ LICHTENTHALER, F.W., CUNY, E., MARTIN, D., RÖNNINGER, S. AND WEBER, T. Practical routes from mono and disaccharides to building blocks with industrial application profiles. In Carbohydrates as organic raw materials. Ed. VCH Publ. New York, 1991. p.p. 207-246.
- ❖ LICHTENTHALER, F.W. AND MONDEL, S. Perspectives in the use of low molecular weight carbohydrates as organic raw materials. *Pure & Appl. Chem.* Vol. 69. No. 9. (1997). p.p. 1853-1866.
- ❖ LICHTENTHALER, F.W., POKINSKYJ, P. AND IMMEL, S. Sucrose as a renewable organic raw material: New, selective entry reactions via computersimulation of its solution conformations and its hydroxyl group reactivities. *Zuckerind (Berlin)*. Vol. 121. (1996). p.p. 174-190.

- ❖ LIN, E.C.C. Dissimilatory pathways for sugars, polyols, and carboxylates. *In E. coli and Salmonella. Cellular and molecular biology*. 2nd. Edition. Vol. 1. ASM Press. USA: 1996.
- ❖ LÓPEZ-MUNGUÍA, A. En: *Biotecnología alimentaria*. Eds. GARCIA, M., QUINTERO, R., LÓPEZ-MUNGUÍA, A. Ed. Limusa. México, 1993. Capítulo 16.
- ❖ LOW, N.H. AND SPORNS, P. Analysis and quantitation of minor di- and trisaccharides in honey, using capillary gas chromatography. *J. Food Sci.* Vol. 53. (1988). p.p. 558-561.
- ❖ LOWRY, O., ROSEBROUGH, J., FARR, A., RONDALL, R. Protein measurement with the Foliphenol reagent, *J. Biol. Chem.* Vol. 193. (1951). p.p. 265-275.
- ❖ MAKI, Y., OHTA, K., TAKAZOE, I., MATSUKUBO, Y., TAKAESU, Y., TOPITSOGLU, V. AND FROSTELL, G. Acid production from isomaltulose, sucrose, sorbitol and xylitol in suspensions of human dental plaque. *Caries Res.* Vol. 17. (1983). p.p. 335-339.
- ❖ Mc. ALLISTER, M., KELLY, C.T., DOYLE, E. AND FOGARTY, W.M. The isomaltulose synthesizing enzyme of *Serratia plymuthica*. *Biotech. Letters.* Vol. 12. (1990). p.p. 667-672.
- ❖ MACDONALD, I. AND DANIEL, J.W. The bio-availability of isomaltulose in man and rat. *Nutr. Rep. Int.* Vol. 28. No. 5. (1983). p.p. 1083-1090.
- ❖ MAKINEN, K.K., SODERLING, E., HURTTIA, H., LEHTONEN, O. AND LUUKKALA, E. Biochemical, microbiologic and clinical comparisons between two dentifrices that contain different mixtures of sugar alcohols. *JADA.* Vol. 111 (1985). p.p. 745-751.
- ❖ NAGAI, Y., SUGITANI, T. AND TSUYUKI, K. Characterization of α -glucosyltransferase from *Pseudomonas mesoacidophila* MX-45. *Biosci. Biotech. Biochem.* Vol. 58. No. 10. (1994). p.p. 1789-1793.
- ❖ NAKAJIMA, Y. Palatinose production by immobilized α -glucosyltransferase. *Proc. Res. Soc. Jpn. Sugar Refin. Tech.* Vol. 33. (1984) p.p. 55-63.
- ❖ NAKAJIMA, Y. Manufacture and utilization of palatinose. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* Vol. 35. No. 2. (1988). p.p. 131-139.
- ❖ NAKAJIMA, Y., SUGITANI, T., TAKANAKA, M. AND FUJII, S. Occurrence of trehalulose, 1-O- α -D-glucopyranosyl-D-fructose, in nectar honey. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi.* Vol. 37. No. 7. (1990). p.p. 554-558.
- ❖ NILSSON, U. AND JÄGERSTAD, M. Hydrolysis of lactitol, maltitol and palatinin by human intestinal biopsies. *Brit. J. Nutr.* Vol. 58. (1987). p.p. 199-206.
- ❖ NISHIMOTO, T., NAKADA, T., CHAEN, H., FUKUDA, S., SUGIMOTO, T., KURIMOTO, M. AND TSUJISAKA, Y. Action of a thermostable trehalose synthase from *Thermus aquaticus* on sucrose. *Biosci. Biotech. Biochem.* Vol. 61. No. 5. (1997). p.p. 898-899.

- ❖ OKUDA, Y., KAWAI, K., CHIBA, Y., KOIDE, Y. AND YAMASHITA, K. Effects of parenteral palatinose on glucose metabolism in normal and streptozotocin diabetic rats. *Horm. Metabol. Res.* Vol. 18. (1986). p.p. 361-364.
- ❖ OOSHIMA, T., IZUMITANI, A., MINAMI, T., FUJIWARA, T., NAKAJIMA, Y. AND HAMADA, S. Trehalulose doesn't induce dental caries in rats infected with mutants Streptococci. *Caries Res.* Vol. 25. (1991). p.p. 277-282.
- ❖ OOSHIMA, T., IZUMITANI, A., SOBUE, S., OKAHASHI, N. AND HAMADA, S. Non-cariogenicity of the disaccharide palatinose in experimental dental caries of rats. *Infect. Immun.* Vol. 39. No. 1. (1983). p.p. 43-49.
- ❖ PAIGE, D.M., BAYLESS, T.M. AND DAVIS, L.R. Palatinin. Digestibility in children. *Nutr. Res.* Vol. 12. No. 1. (1992). p.p. 27-37.
- ❖ PARK, Y. K., UEKANE, R. T., AND PUPIN, A. M. Conversion of sucrose to isomaltulose by microbial glucosyltransferase. *Biotech Letters.* Vol. 14. (1992). p.p. 547-551.
- ❖ PATT, T.E., COLE, G.C. AND HANSON, R.S. Methylobacterium, a new genus of facultatively methylotrophic bacteria. *Int. J. of Syst. Bacteriol.* Vol. 26. No. 2. (1976). p.p. 226-229.
- ❖ ROMANO, A.H. Microbial sugar transport systems and their importance in biotechnology. *TIBTECH* Vol. 4. No. 8. (1986). p.p. 207-213.
- ❖ SAIER, M.H., CHAUVAUX, S., DEUTSCHER, J., REIZER, J. AND YE, J.J. Protein phosphorylation and regulation of carbon metabolism in gram negative versus gram positive bacteria. *TIBS* Vol. 20. (1995). p.p. 267-271.
- ❖ SCHIWEK, H., STEINLE, G. AND HABERL, L. German Pat. Appl. Publ. No. 2217628. 1974.
- ❖ SHALLENBERGER, R.S. Principles of sugar stereochemistry. Structure of the oligosaccharides. In: Advanced sugar chemistry. Ed. Avi Publishing Co. Inc. USA. 1982.
- ❖ SHARPE, E.S., STODOLA, F.H. AND KOEPSSELL, H.J. *J. Am. Chem. Soc.* Vol. 76. (1954). Abstract. 5-D.
- ❖ SHARPE, E.S., STODOLA, F.H. AND KOEPSSELL, H.J. Formation of isomaltulose in enzymatic dextran synthesis. *J. Org. Chem.* Vol. 25. (1960). p.p. 1062-1063.
- ❖ STOCKS, P.K. AND McCLESKEY, C.S. *J. Bacteriol.* Vol. 88. (1964). p.p. 1065.
- ❖ STODOLA, F.H., KOEPSSELL, H.J. AND SHARPE, E.S. *J. Am. Chem. Soc.* Vol. 74. (1952). p.p. 3202-3203.
- ❖ STODOLA, F.H., KOEPSSELL, H.J. AND SHARPE, E.S. The preparation, properties and structure of the disaccharide leucrose. *J. Am. Chem. Soc.* Vol. 78. (1956). p.p. 2514-2518.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

- ❖ SUMNER, J & HOWELL, S. A method for determination of saccharase activity. *J. Biol. Chem.* Vol. 108. (1935). p.p. 51-54.
- ❖ TAKAZOE, I. New trends on sweeteners in Japan. *Int. Dent. J.* Vol. 35. (1985a). p.p. 58-65.
- ❖ TAKAZOE, I. "Palatinose, an isomeric alternative to sucrose". In: Progress in Sweeteners. (Edited by T.H. Grenby). Ed. Elsevier Applied Science. London, U.K., 1989. p.p. 143-167.
- ❖ TAKAZOE, I., FROSTELL, G., OHTA, K., TOPITSOGLOU, V. AND SASAKI, N. Palatinose – a sucrose substitute. Pilot studies. *Swed. Dent. J.* Vol. 9. (1985b). p.p. 81-87.
- ❖ TAKAZOE, I., OHTA, K., KADOMURA, Y. AND NAKAJIMA, Y. Inhibitory mechanism of isomaltulose for insoluble glucan synthesis by Str. mutans. *J. Dental. Res.* Vol. 61. (1982). p.p. 340.
- ❖ TINOCO VALDEZ, Lariza. Producción y caracterización de la enzima isomaltulosa sintasa de Protaminobacter rubrum. Tesis de licenciatura. UNAM. 1997.
- ❖ TOPITSOGLOU, V., SASAKI, N., TAKAZOE, I. AND FROSTELL, G. Effect of frequent rinses with isomaltulose (Palatinose) solution on acid production in human dental plaque. *Caries Res.* Vol. 18. (1984). p.p. 47-51.
- ❖ TSUCHIYA, H.M., KOESELL, H.J., CORMAN, J., BRYANT, G., BOGARD, V.H., FEGER, V.H. & JACKSON, R.W. The effect of certain culture factors on production of dextransucrase by L. mesenteroides. *J. Bacteriology.* Vol. 64. (1952). p.p. 521-526.
- ❖ TSUJI, Y., YAMADA, K., HOSOYA, N. AND MORIUCHI, S. Digestion and absorption of sugars and sugar substitutes in rat small intestine. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* Vol. 32. (1986). p.p. 93-100.
- ❖ TSUYUKI, K., SUGITANI, T., MIYATA, Y., EBASHI, T. AND NAKAJIMA, Y. Isolation and characterization of isomaltulose and trehalulose-producing bacteria from thailand soil. *J. Gen. Appl. Microbiol.* Vol. 38. (1992). p.p. 483-490.
- ❖ ULLMANN, F. Ullman's encyclopedia of industrial chemistry. Isomaltulose and trehalulose, isomalt. 5ª. Ed. Vol. A-25. 1985. p.p. 426-429 436.
- ❖ URAKAMI, T. AND KOMAGATA, K. Cellular Fatty acid composition and coenzyme Q system in gram-negative methanol-utilizing bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* Vol. 25. (1979). p.p.343-360.
- ❖ URAKAMI, T. AND KOMAGATA, K. Electrophoretic comparison of enzymes in the gram negative methanol-utilizing bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* Vol. 27.(1981). p.p. 401-403.
- ❖ URAKAMI, T. AND KOMAGATA, K. Protomonas, a new genus of facultatively methylotropic bacteria. *Int. J. of Syst. Bacteriol.* Vol. 34. No. 2. (1984). p.p. 188-201.

- ❖ USDA. United States Department of Agriculture. Sugar and Sweetener Outlook and Situation. 1981.
- ❖ VAN DER HEIJDEN, A.M., DE GOEDE, A.T.W.J., VAN DER LEIJ, I.G., VAN RANTWIJK, F. AND VAN BEKKUM, H. Synthesis of alkyl fructosides using MCM-41 as catalyst. Vakgroep organische chemie en katalyse Julianalaan 136, 2628BL Delft, The Netherlands. 1997.
- ❖ VÉRONÈSE, T., BOUCHU, A. AND PERLOT, P. Rapid method for trehalulose production and its purification by preparative high-performance liquid chromatography. *Biotechnology Techniques*. Vol. 13. (1999). p.p. 43-48.
- ❖ WELSH, J.D., ROHRER, V. AND WALKER, A. Human intestinal disaccharidase activity. *Arch. Intern. Med.* Vol. 117. (1966). p.p. 488-494.
- ❖ WHITTENBURY, R., PHILLIPS, K.C. AND WILKINSON, J.F. Enrichment, isolation and some properties of methane-utilizing bacteria. *J. of Gen. Microbiol.* Vol. 61. (1970). p.p. 205-218.
- ❖ WHITING, P.H., MIDGLEY, M. AND DAWES, E.A. The role of glucose limitation in the regulation of the transport of glucose, gluconate and 2-oxogluconate, and of glucose metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. of Gen. Microbiol.* Vol. 92. (1976a). p.p. 304-310.
- ❖ WHITING, P.H., MIDGLEY, M. AND DAWES, E.A. The regulation of transport of glucose, gluconate and 2-oxogluconate and of glucose catabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem. J.* Vol. 154. (1976b). p.p. 659-668.
- ❖ YAMADA, K., SHINOHARA, H. AND HOSOYA, N. Hydrolysis of 1-O- α -D-glucopyranosyl-D-fructofuranose (trehalulose) by rat intestinal sucrase-isomaltase complex. *Nutr. Rep. Int.* Vol. 32. No. 5. (1985). p.p. 1211-1219.
- ❖ YOURNO, J., KOHNO, T. AND RUTH, J. Enzyme evolution: generation of a bifunctional enzyme by fusion of adjacent genes. *Nature* (London). Vol. 228. (1970). p.p. 820-824.

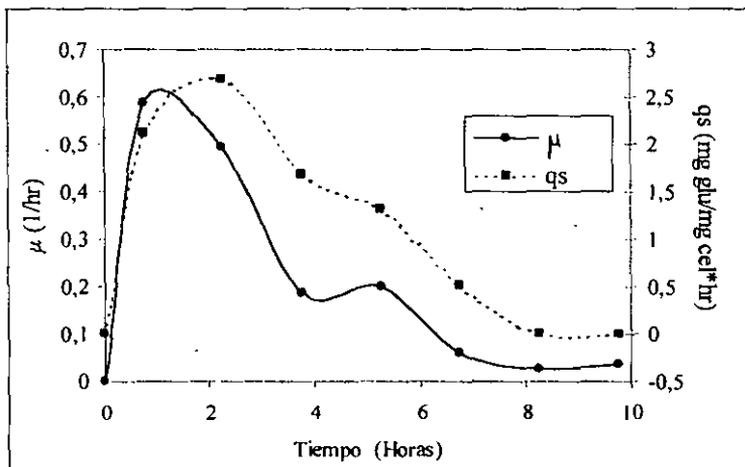
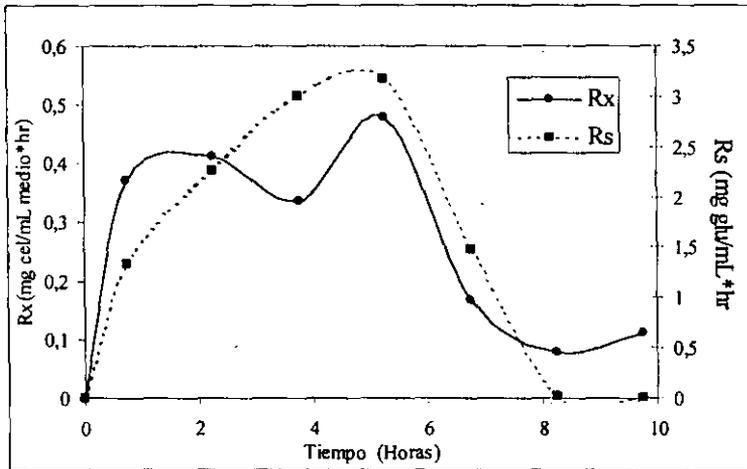
APÉNDICE I

Análisis de los datos obtenidos en el cultivo de *P. rubrum* en diferentes fuentes de carbono.

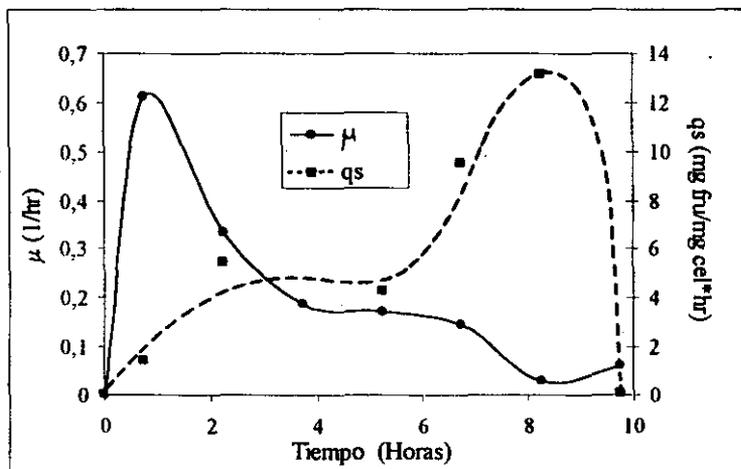
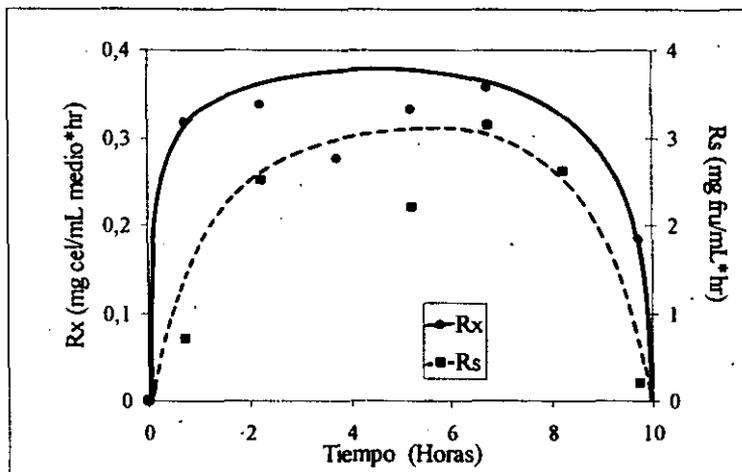
Abreviaturas empleadas en el apéndice.

Abreviatura	Significado	Unidades
Rx	Velocidad de crecimiento	mg células/mL*hora
$\bar{R}x$	Velocidad de crecimiento promedio	mg células/mL*hora
Rs	Velocidad de consumo de sustrato	mg azúcar/mL*hora
$\bar{R}s$	Velocidad de consumo de sustrato promedio	mg azúcar/mL*hora
Rp	Velocidad de aparición de producto	mg azúcar/mL*hora
RG	Velocidad de consumo de glucosa	mg glucosa/mL*hora
RF	Velocidad de consumo de fructosa	mg fructosa/mL*hora
RS	Velocidad de consumo de sacarosa	mg sacarosa/mL*hora
RI	Velocidad de consumo de isomaltulosa	mg isomaltulosa/mL*hora
μ	Velocidad específica de crecimiento	horas ⁻¹
qs	Velocidad específica de consumo de sustrato	mg azúcar/ mg células*hora
qp	Velocidad específica de aparición de producto	mg azúcar/mg células*hora
qG	Velocidad específica de consumo de glucosa	mg glucosa/mg células*hora
qF	Velocidad específica de consumo de fructosa	mg fructosa/mg células*hora
qS	Velocidad específica de consumo de sacarosa	mg sacarosa/mg células*hora
qI	Velocidad específica de consumo de isomaltulosa	mg isomaltulosa/mg células*hora
K	Constante de la velocidad de crecimiento (orden cero)	mg células/mL*hora
t	Tiempo	horas

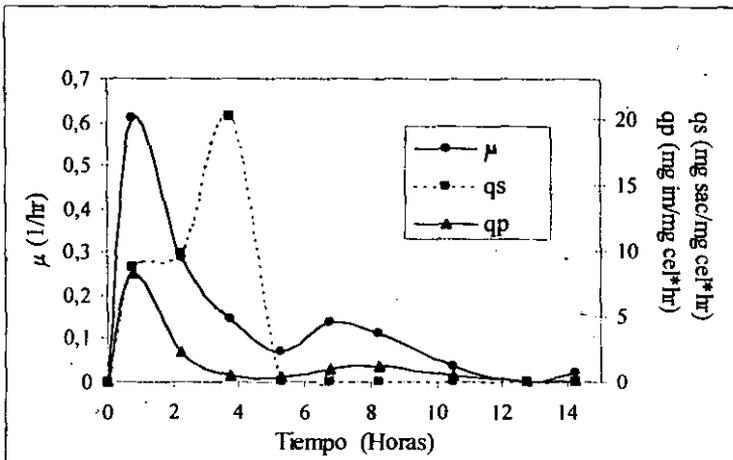
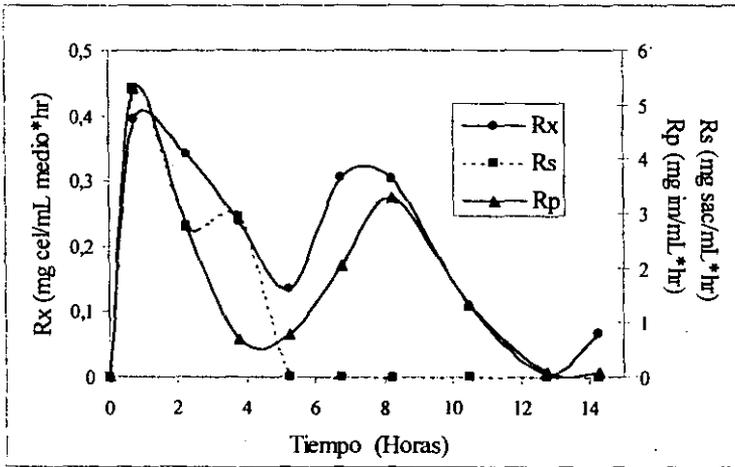
1) glucosa como fuente de carbono.



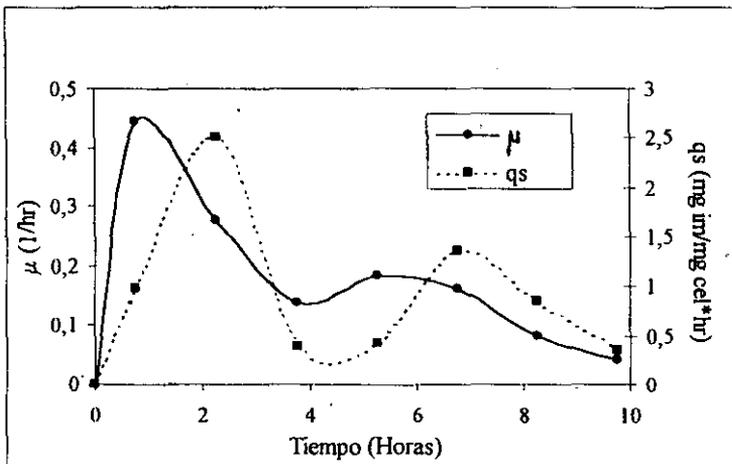
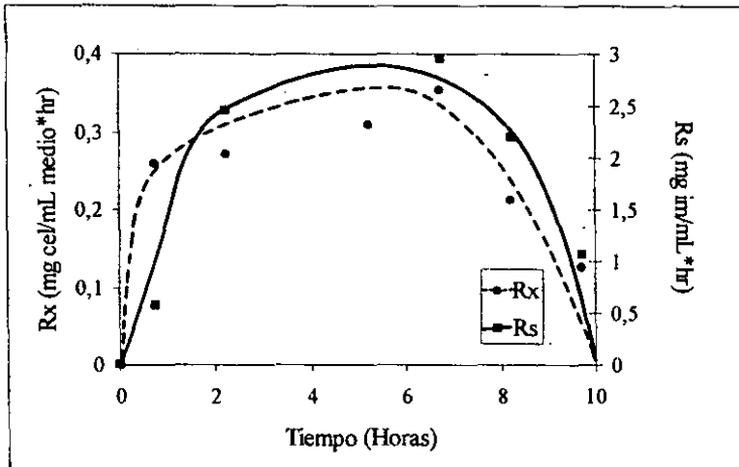
2) fructosa como fuente de carbono.



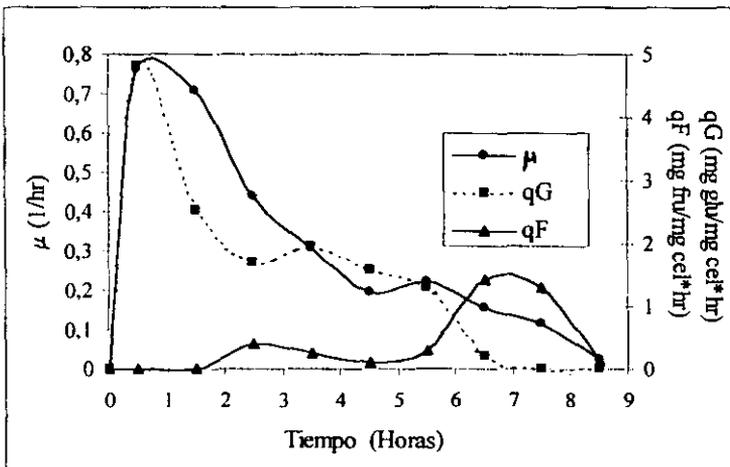
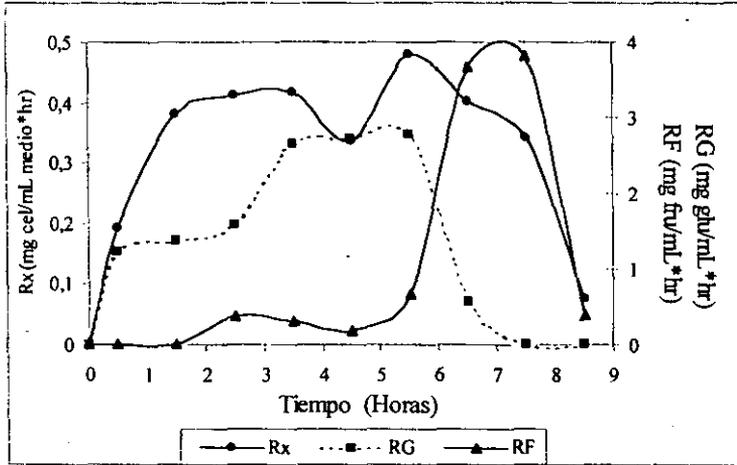
3) sacarosa como fuente de carbono.



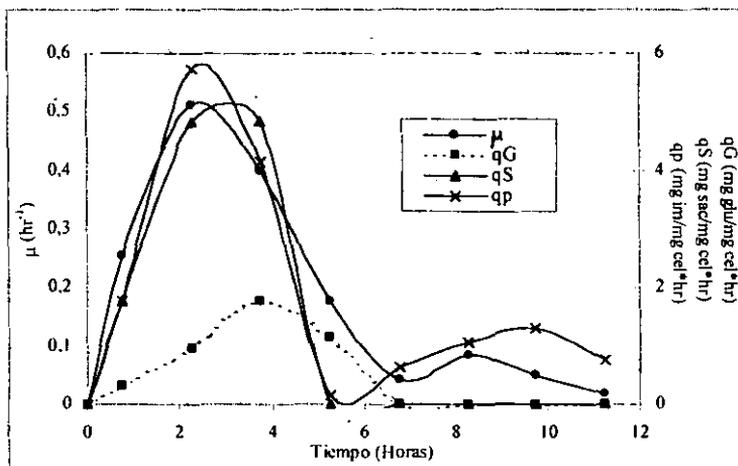
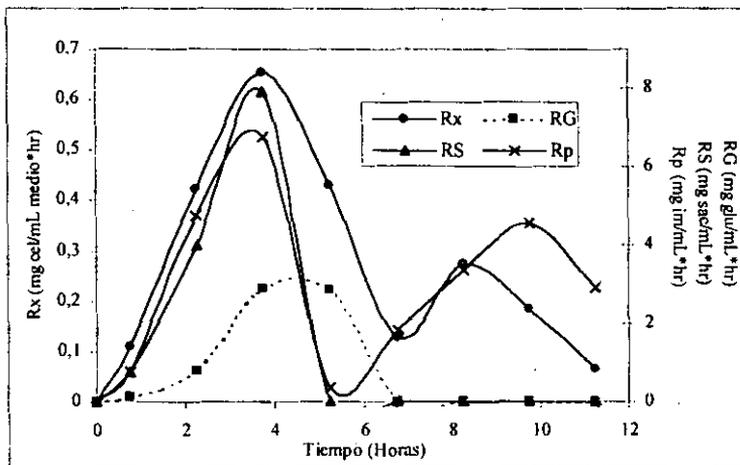
4) isomaltulosa como fuente de carbono.



5) glucosa + fructosa como fuente de carbono.



6) glucosa + sacarosa como fuente de carbono.



7) glucosa + isomaltulosa como fuente de carbono.

