

2015

Evaluación de nitrógeno y carbono en la producción de una enzima con actividad dextransacarasa empleando *Leuconostoc mesenteroides* IBUN 34,1

Diana Marcela Castellanos Amaya
Universidad de La Salle, Bogotá

Indira Geraldine Peraza Espinosa
Universidad de La Salle, Bogotá

Follow this and additional works at: https://ciencia.lasalle.edu.co/ing_alimentos



Part of the [Engineering Commons](#), and the [Food Science Commons](#)

Citación recomendada

Castellanos Amaya, D. M., & Peraza Espinosa, I. G. (2015). Evaluación de nitrógeno y carbono en la producción de una enzima con actividad dextransacarasa empleando *Leuconostoc mesenteroides* IBUN 34,1. Retrieved from https://ciencia.lasalle.edu.co/ing_alimentos/4

This Trabajo de grado - Pregrado is brought to you for free and open access by the Facultad de Ingeniería at Ciencia Unisalle. It has been accepted for inclusion in Ingeniería de Alimentos by an authorized administrator of Ciencia Unisalle. For more information, please contact ciencia@lasalle.edu.co.

UNIVERSIDAD DE LA SALLE
FACULTAD DE INGENIERÍA
Programa de Ingeniería de Alimentos

**Evaluación de nitrógeno y carbono en la producción de una
enzima con actividad dextransacarasa empleando *Leuconostoc
mesenteroides* IBUN 34,1**

Autoras: Diana Marcela Castellanos Amaya
Indira Geraldine Peraza Espinosa

Dirigido por: Ing. Ángela María Otálvaro Álvarez
Asesor Externo: Ing. Gustavo Buitrago Hurtado

BOGOTA
2015

A Dios quien siempre me ha bendecido, quien me ha llenado de sabiduría para hacer siempre lo correcto, quien me ha dado las fuerzas necesarias para avanzar en cada meta que me propongo, quien me acompañó y fortaleció durante toda mi carrea y la realización de este trabajo.

A mi familia quienes siempre han sido un apoyo incondicional para mí, quienes fueron una pieza clave en el desarrollo de este trabajo, a mis padres que siempre me han dado un buen ejemplo y formación intachable, quienes han inculcado en mí el valor del amor, la honestidad, la humildad, la perseverancia y la responsabilidad, a mi hermana quien siempre estuvo dispuesta a colaborar en todo lo que necesité durante el desarrollo de este trabajo, a mi bis abuelita Carmen Rosa por todas sus oraciones, que sin duda fueron indispensables en el desarrollo de este proyecto.

A mi compañera y amiga Indira Geraldine Peraza por haber compartido conmigo esta experiencia, por su arduo trabajo para que este proyecto fuera posible, por su alto grado de responsabilidad, persistencia, buena voluntad y paciencia.

DIANA MARCELA CASTELLANOS AMAYA

A Dios por darme la vida, la sabiduría e iluminar siempre mi camino, por bendecirme a cada instante y por ser esa luz que siempre me muestra lo correcto.

A mi familia que es y siempre ha sido mi punto de apoyo y fuerza en todos los desafíos que emprendo, compartiendo conmigo las alegrías, trabajos y derrotas, dándome un aliento para seguir adelante y triunfar, especialmente a mi madre Sonia Espinosa por su gran ayuda, amor, respaldo y esfuerzo que hoy me hacen culminar una etapa más en mi vida.

A mi compañera y amiga Marcela Castellanos, quien fue la pieza fundamental para culminar este trabajo y con la que tuve la oportunidad de compartir, explorar, discutir y luchar para hacer posible esta meta.

INDIRA GERALDINE PERAZA ESPINOSA

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de Colombia, por permitirnos desarrollar éste proyecto de grado en el Instituto de Biotecnología.

A la Universidad de La Salle por los aportes académicos y el apoyo financiero.

A nuestra directora Ángela María Otálvaro por su dedicación, permanente apoyo, disposición y dirección con sus relevantes aportes, críticas, comentarios y sugerencias para que la realización de este trabajo fuera posible.

Al Ing. Gustavo Buitrago Hurtado, por sus oportunos aportes y sugerencias, apoyo y colaboración en esta investigación.

A la Dra. Sonia Ospina directora del laboratorio de tecnología de enzimas.

A Yhon Florez, Claudia Peña, Yolanda Pardo, a los investigadores de los Laboratorios del IBUN, y a todas aquellas personas que intervinieron con aportes y disposición de servicio en la realización de este trabajo de investigación.

A Lena Prieto y Alfredo López, jurados de este trabajo de grado, por sus aportes y disposición para la culminación de esta investigación.

TABLA DE CONTENIDO

GLOSARIO.....	13
RESUMEN.....	15
INTRODUCCIÓN.....	16
OBJETIVOS.....	18
1. MARCO DE REFERENCIA.....	19
1.1 MARCO TEÓRICO	19
1.1.1 Obtención de prebióticos.....	20
1.1.2 Síntesis de dextrano.....	20
1.1.3 Características generales de <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	23
1.2 ESTADO DEL ARTE.....	24
2. METODOLOGÍA DE LA EXPERIMENTACIÓN	27
2.1 ETAPA 1. CARACTERIZACIÓN DEL MICROORGANISMO	27
2.2 ETAPA 2. BANCO ACTIVO Y CURVA DE CALIRACIÓN	27
2.2.1 Banco activo.....	27
2.2.2 Curva de calibración.....	29
2.3 ETAPA 3. CINETICA DE CRECIMIENTO.....	29
2.4 ETAPA 4. EVALUACIÓN DE LA SUSTITUCIÓN DE LA FUENTE DE NITRÓGENO.....	30
2.5 ETAPA 5. EVALUACIÓN DE LOS CAMBIOS EN LA CONCENTRACIÓN DE LA FUENTE DE CARBONO	33
2.6 ETAPA 6. APLICACIÓN DEL MÉTODO DE DIGESTIÓN Y GRAVIMETRÍA DEXTRANSACARASA / SACAROSA	34
2.7 ETAPA 7. ANÁLISIS ESTADISTICO	34
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
3.1 IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO.....	36
3.2 CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE <i>Leuconostoc mesenteroides</i> IBUN 34,1.	36
3.3 EVALUACIÓN DE FUENTE DE NITRÓGENO	39
3.3.1 Sustitución de extracto de levadura por dihidrógeno fosfato de amonio.....	39
3.3.2 Sustitución parcial de extracto de levadura por harina de soya.	43
3.4 EVALUACIÓN DE FUENTE DE CARBONO.	46

3.5	EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD CON EL MÉTODO DE DIGESTIÓN Y GRAVIMETRÍA DEXTRANSACARASA/SACAROSA.....	51
	CONCLUSIONES.....	53
	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	56

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Medios de cultivo para la producción de enzimas, donde la fuente de carbono es sustrato e inductor de la enzima.....	21
Tabla 2. Fuentes de nitrógeno empleadas en medios de cultivo para la producción de enzimas microbianas.	22
Tabla 3. Medio de cultivo estándar	29
Tabla 4. Composición de los medios de cultivo empleados para la evaluación de la fuente de nitrógeno.....	31
Tabla 5. Sustituciones de la fuente de carbono evaluadas.....	33
Tabla 6. Resumen de datos para cinética de crecimiento del inóculo y la fermentación	37
Tabla 7. Parámetros cinéticos de crecimiento de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> IBUN 34,1 en las etapas de obtención de inóculo y fermentación.....	39
Tabla 8. Densidad óptica y biomasa al término de la fermentación para las diferentes sustituciones de extracto de levadura por dihidrógeno fosfato de amonio	40
Tabla 9. Comparación múltiple de Dunnett con el control (medio estándar 0% de sustitución de la fuente de nitrógeno) para las sustituciones del extracto de levadura por dihidrógeno fosfato de amonio para la obtención de biomasa	41
Tabla 10. Actividad enzimática al término de la fermentación para las diferentes sustituciones de extracto de levadura por dihidrógeno fosfato de amonio	41
Tabla 11. Comparación múltiple de Dunnett con el control (medio estándar 0% de sustitución de la fuente de nitrógeno) para las sustituciones del extracto de levadura por dihidrógeno fosfato de amonio en cuanto a la actividad enzimática de transferencia obtenida.....	42

Tabla 12. Densidad óptica y biomasa al término de la fermentación para las diferentes sustituciones de extracto de levadura por harina de soya	43
Tabla 13. Comparación múltiple de Dunnett con un control (medio estándar 0% de sustitución de la fuente de nitrógeno) para las sustituciones del extracto de levadura por harina de soya en cuanto a la obtención de biomasa	44
Tabla 14. Actividad enzimática de transferencia al término de la fermentación para las diferentes sustituciones de extracto de levadura por harina de soya.....	44
Tabla 15. Comparación múltiple de Dunnett con un el control (medio estándar 0% de sustitución de la fuente de nitrógeno) para las sustituciones del extracto de levadura por harina de soya en cuanto a la actividad enzimática de transferencia obtenida	46
Tabla 16. Biomasa y actividad enzimática para las diferentes concentraciones de la fuente de carbono	47
Tabla 17. Comparación múltiple de Dunnett con un control (medio estándar 0% de sustitución de la fuente de nitrógeno) para la formulación de sustitución del 25% de fuente de nitrógeno por dihidrógeno fosfato de amonio en cuanto a la obtención de biomasa.....	49
Tabla 18. Comparación múltiple de Dunnett con un control (medio estándar 0% de sustitución de la fuente de nitrógeno) para la formulación de sustitución del 25% de fuente de nitrógeno por dihidrógeno fosfato de amonio en cuanto a la actividad enzimática de transferencia obtenida.....	49
Tabla 19. Comparación múltiple de Dunnett con un control (medio estándar 0% de sustitución de la fuente de nitrógeno) para la formulación de sustitución del 50% de fuente de nitrógeno por dihidrógeno fosfato de amonio en cuanto a la obtención de biomasa.....	50
Tabla 20. Comparación múltiple de Dunnett con un control (medio estándar 0% de sustitución de la fuente de nitrógeno) para la formulación de sustitución del 50% de fuente de nitrógeno por dihidrógeno fosfato de amonio en cuanto a la actividad enzimática de transferencia obtenida.....	50

Tabla 21. Actividad enzimática obtenida con el método de digestión y gravimetría
dextranasa/sacarosa51

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Formulación estándar del medio de cultivo	28
Figura 2. Formulaciones sustitución parcial de extracto de levadura por di-hidrogeno fosfato de amonio.....	31
Figura 3. Medios de cultivo estériles con la sustitución parcial de extracto de levadura por harina de soya.....	32
Figura 4. Preparación de la curva de calibración para la cuantificación de azúcares reductores..	33
Figura 5. Vista microscópica al 100X del microorganismo <i>Leuconostoc mesenteroides</i> IBUN 34,1	36
Figura 6. Cinética de crecimiento de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> (IBUN 34,1)	37
Figura 7. Comportamiento de la biomasa para la sustitución de dihidrógeno fosfato de amonio.	40
Figura 8. Comportamiento de la actividad enzimática de transferencia con sustitución de dihidrógeno fosfato de amonio.....	42
Figura 9. Comportamiento de biomasa con sustitución de harina de soya	43
Figura 10. Comportamiento de la actividad enzimática de transferencia con sustitución de harina de soya.....	45
Figura 11. Medios de cultivo con sustitución parcial de harina de soya.....	45
Figura 12. Variación de la fuente de carbono en la mejores fuentes de nitrógeno (dihidrógeno fosfato de amonio 25% y 50%)	48
Figura 13. Obtención de polímero por método de digestión y gravimetría dextransacarasa/sacarosa	52

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Protocolo método tinción de Gram.....	61
Anexo 2. Protocolo curva de calibración de <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	63
Anexo 3. Calculos para determinar la cantidad de nitrógeno que aporta el dihidrógeno fosfato de amonio y harina de soya.....	66
Anexo 4. Protocolo determinación de actividad enzimática: transferencia e hidrolítica	67
Anexo 5. Protocolo método colorimétrico para la determinación de glucosa.....	69
Anexo 6. Protocolo muestra de calculo en la determinación en la actividad enzimática.....	71
Anexo 7. Protocolo tamón fosfato pH 5,5 – 16% sacarosa	73
Anexo 8. Protocolo preparación reactivo DNS	74
Anexo 9. Protocolo método colorimétrico para la determinación de azúcares reductores ácido dinitrosalicílico (DNS)	75
Anexo 10. Análisis estadístico para la sustitución parcial de la fuente de nitrógeno por dihidrogeno fosfato de amonio y harina de soya.....	77
Anexo 11. Análisis estadístico para la variación en la concentración en la fuente de carbono para las formulaciones de 25% y 50% de sustitución de fuente de nitrógeno por dihidrogeno fosfato de amonio.....	88
Anexo 12. Protocolo de la actividad con el método de digestión y gravimetría dextranasa/sacarosa.	99

GLOSARIO

Actividad enzimática: la Comisión Internacional de Enzimas sugirió como definición estándar de unidad de actividad “la cantidad de enzima que transforma una micromol (μmol) de sustrato por minuto bajo condiciones definidas”. De ese modo, en una fermentación cuyo objetivo es la obtención de una enzima, la producción no se cuantifica en términos de la cantidad de proteína producida, sino de la actividad catalítica disponible, expresada en términos de la actividad enzimática.

Actividad de transferencia: cantidad de enzima necesaria para transferir un μmol de glucosa en un minuto a una temperatura de 30°C y pH 7 empleando como sustrato sacarosa.

Actividad hidrolítica: actividad enzimática por medio de la cual la sacarosa se desdobra en fructosa y glucosa. También definida como la cantidad de enzima necesaria para liberar una micromol (μmol) de glucosa en un minuto.

Dextrano: los dextranos son cadenas de unidades $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$ que forman un polisacárido en donde predominan los enlaces α - (1-6) (95% de los enlaces), con ramificaciones α - (1-3). Los diferentes tipos de dextrano difieren en la longitud de la cadena y grado de ramificación. Al igual que las dextrinas, los dextranos se han utilizado en multitud de aplicaciones importantes, debido a su naturaleza no iónica y buena estabilidad. Son ampliamente utilizados como expansores de volumen sanguíneo, en la industria farmacéutica, en la industria alimentaria y como medios cromatográficos.

Dextran sacarasa: enzima de transferencia que se produce industrialmente por la bacteria láctica *Leuconostoc mesenteroides* y que se caracteriza por sintetizar a partir de la sacarosa un polímero de glucosa con enlaces α -(1-6) en la cadena principal y con ramificaciones en α -(1-3), α -(1-2) o α -(1-4).

Enzima glucansacarasa: enzimas producidas principalmente por dos géneros bacterianos *Leuconostoc* y *Streptococcus*. La enzima glucansacarasa obtenida en la fermentación, presenta al

menos dos tipos de actividad: de hidrólisis, con la que la sacarosa se desdobra en fructosa y glucosa, y de transferencia con la que la glucosa es transferida a la estructura que conforma el biopolímero.

Leuconostoc mesenteroides: microorganismo Gram positivo, de morfología cocoide presentándose en parejas o formando cadenas, anaerobio facultativo, no móvil y no formador de esporas. El género *Leuconostoc*, está ampliamente distribuido en plantas, productos lácteos y otros productos alimenticios. No son patógenos para las plantas ni para los animales, incluido el hombre.

Prebióticos: son ingredientes no digeribles de los alimentos que afectan beneficiosamente al hospedador por una estimulación selectiva del crecimiento o por la actividad de una bacteria. Generalmente están compuestos por hidratos de carbono de cadena corta, que pueden ser fermentados a lo largo del tracto gastrointestinal y estimular el crecimiento de bifidobacterias u otras bacterias potencialmente beneficiosas.

Probióticos: microorganismos vivos que cuando son suministrados en cantidades adecuadas promueven beneficios en la salud del organismo hospedador. Se utilizan en alimentos, especialmente en productos lácteos fermentados.

RESUMEN

Algunas de las enzimas con actividad dextransacarasa, son empleadas en la obtención de polímeros con características prebióticas, que pueden ser utilizadas en la industria de alimentos. Para la obtención de estas enzimas, se emplean microorganismos como *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactococcus lactis*. El objetivo de este trabajo, fue evaluar el efecto de la fuente de nitrógeno y de carbono en una fermentación para la producción de una enzima con actividad dextransacarasa. La cepa empleada fue *Leuconostoc mesenteroides* IBUN 34,1, suministrada por el Grupo de Tecnología de Enzimas del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia. Las fuentes de nitrógeno empleadas fueron dihidrógeno fosfato de amonio y harina de soya, evaluadas en 5 niveles (0, 25, 50, 60 y 75%) como sustitutos del extracto de levadura y variaciones en la concentración de la fuente de carbono de 5, 6, 7 y 8%.

En cuanto a la evaluación de las fuentes de nitrógeno, se evidenció un aumento en la actividad enzimática de transferencia con la sustitución del 25% de extracto de levadura por dihidrógeno fosfato de amonio, alcanzando 7,44U/mL y superando la actividad obtenida para el medio estándar que fue de 6,77U/ml. Por otro lado en los ensayos realizados con harina de soya, se obtuvieron valores de actividad enzimática de transferencia de 7,06 U/mL y 8,82 U/mL para las sustituciones del 50% y 60% respectivamente, sin embargo estos valores pueden estar influenciados por la baja solubilidad de este compuesto en el medio de cultivo. Respecto a la variación de la fuente de carbono, ésta se evaluó en las sustituciones de extracto de levadura por dihidrógeno fosfato de amonio de 25 y 50%. Observándose que la máxima actividad enzimática de transferencia correspondiente a 7,79 U/mL, se alcanzó con el medio en donde el extracto de levadura estaba sustituido en un 25% por dihidrogeno fosfato de amonio y se empleaba 5% de sacarosa, lo que implica una mayor actividad con una menor cantidad de la fuente de carbono respecto al medio estándar.

INTRODUCCIÓN

La industria alimentaria se enfrenta con frecuencia a la necesidad de crear productos que además de poseer mejores características organolépticas, sean de carácter funcional para el consumidor y tengan una vida útil más prolongada. Una categoría de los alimentos funcionales, que tiene gran interés en la población, la industria alimentaria y la comunidad científica, son los ingredientes prebióticos y la fibra dietaria, los cuales pueden modificar positivamente los procesos fisiológicos y biológicos, jugando un papel importante en la nutrición y en el tratamiento de ciertas patologías humanas.

Dentro de los compuestos que poseen estas características se encuentra el dextrano, que puede ser considerado para el desarrollo de productos funcionales que contemplen la presencia de fibra soluble. Pues este biopolímero producido por cultivo de *Leuconostoc mesenteroides* (peso molecular de 850 KDa y alta solubilidad en agua), se caracteriza por tener un porcentaje de fibra soluble de 84,7% y fibra dietaria total de 86,1%.

Actualmente, la producción del dextrano se lleva a cabo, a partir de sacarosa y de una enzima obtenida por el cultivo de *Leuconostoc mesenteroides*, utilizando un medio en el cual se emplea como fuente de nitrógeno (10% p/v) de extracto de levadura y sacarosa (6% p/v) como fuente de carbono.

Con el fin de generar alternativas al proceso actual de obtención de la enzima dextransacarasa producida por *Leuconostoc mesenteroides* IBUN 34,1), surgió el interés por evaluar el efecto que sobre éste ocasionaba la sustitución parcial de la fuente de nitrógeno estándar (extracto de levadura) por fuentes alternas, así como el efecto de cambios en la concentración de la fuente de carbono empleada (sacarosa 6% p/v). En ese sentido, se retomaron trabajos previos realizados por el Grupo de Tecnología de Enzimas de la Universidad Nacional de Colombia (GTEUNC), que habían sugerido la posibilidad de trabajar con harina de soya y dihidrógeno fosfato de amonio, como posibles sustituyentes del extracto de levadura y se profundizó en su estudio, evaluando dichas fuentes en 5 niveles de sustitución; 0, 25, 50, 60 y 75. Adicionalmente, se analizó el efecto al variar la concentración de la fuente de carbono entre 5, 6, 7 y 8%.

Por lo tanto, la pregunta a la que se buscó dar respuesta en esta investigación fue: ¿Será posible, por medio de cambios en las fuentes de nitrógeno y en la concentración de la fuente de carbono del medio del cultivo estandarizado por el Grupo de Tecnología de Enzimas de la Universidad Nacional (GTEUN) para la obtención de una enzima a partir de *Leuconostoc mesenteroides* IBUN 34,1, generar una alternativa que permita igualar o incrementar la actividad enzimática de transferencia reportada (5,74 U/mL)?

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de los cambios en la fuente de nitrógeno y la concentración de la fuente de carbono, del medio estandarizado para la producción de una enzima con actividad dextransacarasa, obtenida a partir de cultivos de *Leuconostoc mesenteroides* IBUN 34,1.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el crecimiento del microorganismo *Leuconostoc mesenteroides* IBUN 34,1 por medio de una curva (patrón) que relacione la concentración con la biomasa (peso seco).
- Evaluar el efecto de la sustitución parcial del extracto de levadura empleada en el medio estandarizado, por harina de soya y dihidrógeno fosfato de amonio, sobre la producción de biomasa en el cultivo de *Leuconostoc mesenteroides* IBUN 34,1.
- Determinar el efecto de cambios en la concentración de la fuente de carbono estandarizada (sacarosa 6% p/v) sobre la actividad enzimática de la enzima obtenida con la fuente o las fuentes de nitrógeno seleccionadas.

1. MARCO DE REFERENCIA

En esta sección, se describen los aspectos más relevantes del presente trabajo tales como las características de la cepa *Leuconostoc mesenteroides* IBUN 34.1, medio empleado, parámetros específicos para el crecimiento del microorganismo, las principales fuentes de nitrógeno, la síntesis de dextrano y el efecto de algunos de los parámetros de los procesos fermentativos sobre la obtención de biomasa y la actividad enzimática.

1.1 MARCO TEÓRICO

Durante la última década se ha incrementado el número de estudios sobre el rol que algunas cepas de bacterias ácido lácticas, entre las que se encuentran *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* y *Leuconotoc mesenteroides*, pudieran jugar al ser empleadas como cultivos probióticos y como productores de prebióticos (Topisirovic, 2006, citado en Cabeza, 2006). Esto debido a la importancia que hoy en día se ha dado a la tecnología enzimática dentro de la biotecnología y específicamente dentro del sector alimentario, en donde es empleada para la hidrólisis de almidones, para obtener jarabes de diferentes composiciones y propiedades físicas, en productos lácteos por el uso del cuajo para la producción de quesos, en panadería mejorando las características de las harinas, en la industria de frutas para la clarificación y procesamiento de jugos, en el procesamiento de carne para el ablandamiento, en la industria cervecera para la fermentación de la malta, en la industria de grasas y cereales para minimizar subproductos indeseables y en la elaboración de películas comestibles (Carrera, 2003).

Uno de los cultivos empleados con este fin, es el de la cepa *Leucosnotoc mesenteroides*, que crece a temperaturas entre 5 y 30°C, con una condición óptima entre 25 y 30°C, a pH entre 6,0 – 6,9, en ambientes microaerófilicos (Santos, Teixeira y Rodrigues, 1999). A partir de este cultivo, es posible generar extractos enzimáticos con actividad dextransacarasa, capaces de transformar sustratos como azúcares (monosacáridos, disacáridos y polisacáridos), polialcoholes, citrato y algún aminoácido (arginina) en prebióticos (dextranos) (Quirasco, Munguía, Simeon, Monsan y Farrés, 1999).

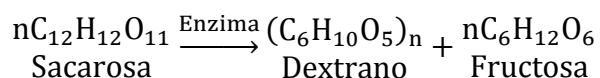
Se ha evidenciado que los glucooligosacáridos producidos por *Leuconostoc* son metabolizados por las bacterias intestinales potencialmente beneficiosas, tales como *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* y en especial *Bacteroides*, mientras que cepas potencialmente nocivas como *enterobacterias* y *Clostridium* no pueden metabolizarlos del mismo modo, generando efectos benéficos para el organismo de quienes los consuman (Sarhini et al., 2013, p. 1939).

1.1.1 Obtención de prebióticos. Los prebióticos se obtienen principalmente por la hidrólisis de la lactosa, la cual se puede realizar por tratamiento con ácido a alta temperatura (150°C), o por catálisis enzimática con β-galactosidasa (Corzo et al., 2015)

En su mayoría, estos compuestos se utilizan como ingredientes en la elaboración de galletas, cereales, chocolates, cremas de untar y productos lácteos (Organización Mundial de Gastroenterología, 2008, p. 5).

1.1.2 Síntesis de dextrano. La síntesis del prebiótico dextrano, ocurre por acción de la enzima dextransacarasa, de expresión inducible por sacarosa. Esta enzima utiliza la energía del enlace de la sacarosa para catalizar la transferencia de una molécula de glucosa a la cadena del polímero, liberándose una molécula de fructosa. Además puede ocurrir que la molécula de glucosa se una a otro receptor diferente, como la maltosa, originándose en este caso oligosacáridos no digeribles con propiedades prebióticas interesantes, algunos de los cuales se comercializan para nutrición humana y dermocosmética (Monsan et al., 2001).

Cuando la cepa de *Leuconostoc mesenteroides* es cultivada en medios ricos en sacarosa, se induce la producción de una enzima extracelular, la dextransacarasa, que tiene la capacidad de producir dextrano y fructosa a partir de la sacarosa, como se presenta a continuación:



Para medir el potencial del extracto enzimático obtenido para la síntesis de estos polímeros, se habla de las unidades de actividad presentes en un volumen conveniente o en una masa determinada

de muestra, “de este modo, la unidad de actividad es la medida de velocidad a la cual transcurre la reacción, es decir, la cantidad de sustrato consumido o de producto formado en una unidad de tiempo arbitraria” (Santos et al., 1999, p. 177).

Dicha velocidad de reacción dependerá de parámetros experimentales, como es el pH, tipo de amortiguador, temperatura (entre 20 y 38°C), naturaleza del sustrato (fuentes de carbono y nitrógeno), fuerza iónica, concentración de activadores y otras variables. Por lo tanto, éstos han de especificarse en la definición de la unidad de actividad enzimática, expresada como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1µmol de sustrato en producto en 1 minuto de reacción, bajo condiciones previamente determinadas (Devlin, 1999).

Para el control de la síntesis de enzimas, las células microbianas disponen de los mecanismos de inducción (en donde se requiere una sustancia, generalmente el sustrato de la enzima, como inductor) y represión (cuando se presenta inhibición en la síntesis de enzimas, generalmente inducibles, por intermediarios producidos por el rápido catabolismo de la fuente de carbono) (García, Quintero y López, 2004).

En la tabla 1 se presentan algunos ejemplos en los cuales la fuente de carbono del medio, es el sustrato de la enzima que se desea producir, desempeñando entonces varias funciones: fuente de carbono y de energía para el microorganismo e inductor de la enzima.

Tabla 1. Medios de cultivo para la producción de enzimas, donde la fuente de carbono es sustrato e inductor de la enzima

Enzima	Fuente de carbono	Microrganismo
α-Amilasa	Almidón	<i>Bacillus subtilis</i>
Celulasa	Celulosa	<i>Trichoderma viride</i>
Dextranasa	Dextrana	<i>Penicillium funiculosum</i>
Glucoamilasa	Almidón	<i>Aspergillus niger</i>
Dextransacarasa	Sacarosa	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Naringinasa	Naringina	<i>Aspergillus niger</i>
Lactasa	Lactosa	<i>Kluyveromyces lactis</i>
Levansacarasa	Sacarosa	<i>Bacillus subtilis</i>
Glucosa oxidasa	glucosa	<i>Aspergillus niger</i>

Fuente: García, Quintero y López (2004), p. 588.

Por otro lado, la fuente de nitrógeno empleada para la obtención de las enzimas, puede ser seleccionada de un gran número de alternativas. Es evidente que en el caso de enzimas proteolíticas

la selección es un punto crítico: se prefieren como fuentes de carbono almidones o lactosa y desde luego proteínas. La tabla 2 muestra las principales fuentes de nitrógeno, disponibles para la producción de enzimas microbianas, aunque por lo general se prefiere a las formas complejas por ser más económicas (García et al. 2004, p. 588).

Tabla 2. Fuentes de nitrógeno empleadas en medios de cultivo para la producción de enzimas microbianas.

Fuentes inorgánicas Sulfato de amonio Nitratos (potasio, calcio...)	Fuentes orgánicas no proteicas Urea Bases nitrogenadas
Fuentes proteicas vegetales Pasta de soya Pasta de girasol Pasta de algodón Salvado de trigo Salvado de arroz Agua de cocimiento de maíz Diversos hidrolizados Malta (cebada)	Fuentes proteicas animales Caseína Proteínas de suero de leche Peptonas Hidrolizado de pescado Hidrolizado de carne
Fuentes proteicas microbianas Extracto de levadura Vinazas	

Fuente: García, Quintero y López, (2004), p. 588

En la obtención de dextranos por medio de un extracto enzimático con actividad dextransacarasa, ocurren tres procesos: crecimiento del microorganismo, síntesis y excreción de la enzima dextransacarasa y síntesis del dextrano por acción de la enzima. Dado que la enzima es inducible en el género *Leuconostoc*, se requiere de sacarosa en el medio de cultivo para la obtención del polímero. La sacarosa actúa como fuente de carbono y energía para el microorganismo, además de inductor y sustrato para la enzima. Con una concentración de 100g/L de sacarosa es posible obtener 25g/L de dextrano. Además de la sacarosa, en el medio de cultivo se debe emplear extracto de levadura (2,5%), sulfato de magnesio (0,2%), fosfato dipotásico (5%) y oligoelementos (García et al., 2004).

1.1.3 Características generales de *Leuconostoc mesenteroides*. *Leuconostoc mesenteroides* es un microorganismo Gram positivo, de morfología cocoide, anaerobio facultativo, no móvil y no formador de esporas. Generalmente suele tener forma cocoide, presentándose en parejas o formando cadenas. Sin embargo, la morfología celular puede variar en función de las condiciones de crecimiento. Así, cuando el medio de cultivo es agar, las células presentan una apariencia esférica, mientras que cuando este microorganismo es cultivado en caldo, las células suelen tener forma bacilar, pudiéndose confundir con lactobacilos y formando largas cadenas. Las colonias normalmente son pequeñas, con unos diámetros inferiores a 1 mm, lisos, redondos y de un color blanco grisáceo. Diferentes tipos de colonias se pueden diferenciar cuando crecen sobre agar de sacarosa, dependiendo de la estructura química del tipo predominante de dextrano formado. (Sneath et al., 1986).

- **Crecimiento y metabolismo.** *Leuconostoc mesenteroides*, se desarrolla en un rango de temperatura de 10-37°C, siendo la óptima 20-30°C. En cuanto a la velocidad de crecimiento, *Leuconostoc mesenteroides* presenta un tiempo de generación más corto que otras subespecies y un buen crecimiento puede ser obtenido en 24 horas a una temperatura de 30°C.

Cuando *Leuconostoc mesenteroides* crece en medio de cultivo líquido es frecuente observar una importante y uniforme turbidez debido a la formación de largas cadenas celulares que tienden a sedimentar. En cuanto a los requerimientos nutritivos es necesario un medio enriquecido para su crecimiento, que contenga factores de crecimiento y aminoácidos. De hecho, *Leuconostoc mesenteroides* precisa ácido glutámico y valina, y de forma adicional, entre el 11–86% de las cepas requieren riboflavina, piridoxal y ácido fólico para su crecimiento.

El crecimiento también es dependiente de la presencia de carbohidratos fermentables, como la lactosa, fructosa, sacarosa y la glucosa, que es fermentada por medio de la enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa. Los productos finales más importantes resultantes de la fermentación son el lactato, etanol, D (-) ácido láctico y CO₂. Normalmente los polisacáridos y los alcoholes no son fermentados (Sneath et al., 1991).

1.2 ESTADO DEL ARTE

A continuación, se presentan algunos estudios asociados a la producción de una enzima con actividad dextranasa a partir de *Leuconostoc mesenteroides*, que fueron tomados como base para el desarrollo de esta investigación.

Tsuchiya et al. (1952) describieron la producción de dextranos por medio de un proceso de dos etapas: la primera de fermentación, donde se empleó un bajo contenido de sacarosa (2%), con el fin de minimizar la producción de dextrano y maximizar la producción de un extracto enzimático con actividad dextranasa y la segunda de producción del dextrano, donde se realizó la aplicación de la enzima cruda o parcialmente purificada, para la síntesis de dextrano, utilizando como sustrato sacarosa (150g/L). Con dichas condiciones produjeron entre 1 y 2 unidades de actividad/mL.

Santos et al. (1999) estudiaron la producción de dextranasa, dextrano y fructosa por fermentación de sacarosa usando *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512, evaluando cambios de temperatura (20 a 40°C), pH (5,5 y 6,7) y concentración de sacarosa (10 a 120g/L) sobre el rendimiento del proceso. Encontraron que las condiciones óptimas de temperatura y pH para la producción de dextrano y fructosa fueron de 35°C y 5,5 respectivamente. Así mismo evidenciaron que el crecimiento celular no se inhibe por altas concentraciones de sacarosa. Hallaron que la actividad de la enzima aumentó con la concentración de sacarosa hasta que ésta alcanzó los 40 g/dm³. Igualmente, observaron que para concentraciones de sacarosa entre 80 y 120 g/dm³, las mediciones de la actividad de la enzima, se tornaron difíciles debido a la presencia de dextrano y fructosa en los extractos, aún después de las operaciones de lavado y centrifugado.

Rodriguez, Lona y Franco (2003) estudiaron el efecto de la concentración de fosfato en la producción de dextranasa mediante la fermentación de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512 en presencia de sacarosa como sustrato, una fuente de nitrógeno variable (licor de maíz o extracto de levadura) y minerales. El medio estándar para la producción de dextranasa lo prepararon utilizando 0,1 M de K₂HPO₄. Obtuvieron como resultados, que el aumento en el nivel de fosfato a 0,3M, promovió la producción biomasa y el aumento de la actividad enzimática. Así

mismo, encontraron que una concentración de fosfato superior a 0,3M era capaz de mantener los valores de pH por encima de 5,0 durante todo el proceso, evitando la desnaturalización de la enzima.

Rodríguez y Hanssen (2007) en su trabajo con la cepa *Leuconostoc mesenteroides* NRRLB512-F, para la obtención de algunos complejos enzimáticos, obtuvieron dextrano y fructosa utilizando residuos agroindustriales. Los residuos empleados fueron de: naranja, piña y cachaza de caña panelera, con un porcentaje de sacarosa entre 2 y 5%, sometidos a pretratamientos. En el análisis fisicoquímico, los resultados mostraron que todos los sustratos presentaban concentraciones por encima de 20g/L de sacarosa, característica adecuada para llevar a cabo el proceso de fermentación sin necesidad de adición de otra fuente de carbono. Un factor importante en la producción y el crecimiento bacteriano fue la temperatura de proceso, observando que en un intervalo de temperatura entre 20 y 35°C, se incrementó la producción de dextrano en 3,4g/L y 5,04g/L de fructosa utilizando como sustrato la cascara de naranja. Según los resultados encontrados, el mejor rendimiento en cuanto a los productos, se obtuvo con la cascara de naranja, con un rendimiento global de dextrano de 24,21% y un rendimiento global de fructosa de 43,32%.

Soler (2009) estudio la transferencia de oxígeno durante la fermentación con *Lactococcus lactis*, mediante fermentaciones en biorreactor, variando los niveles de agitación y aireación externo, con el fin de observar el comportamiento de la concentración de oxígeno en el transcurso de la fermentación y su relación con los parámetros de evaluación del cultivo. Se encontró que las variables que mayor efecto tuvieron sobre la actividad transferencia, fueron los cambios en el flujo de recirculación, la agitación, la presión en el aireador externo y el diámetro de la burbuja. Se alcanzó un máximo de actividad de transferencia de 6,75 U/mL, empleando baja aireación (1,75 vvm) y una agitación de 250 rpm.

Vanegas (2006) determinó la influencia de las fuentes de carbono y nitrógeno sobre la producción de la glucansacarasa, obtenida por fermentación con la cepa *Lactococcus lactis* IBUN 34.1. Empleó diferentes fuentes de nitrógeno inorgánicas y orgánicas (harina de soya, dihidrógeno fosfato de amonio, urea y caseína) y variaciones en las concentraciones de la fuente de carbono (sacarosa), encontrando que la concentración de fuente de nitrógeno en el medio que permitía la mayor

actividad de transferencia era de 0,7% en peso de extracto de levadura y la concentración de fuente de carbono de 7% en peso de sacarosa. Bajo dichas condiciones la enzima obtenida presentó una actividad de transferencia de 6,3 U/mL.

Helen, Mukerjea y Robyt (2011) estudiaron 9 métodos para la determinación de actividad enzimática, encontrando que la digestión gravimétrica fue la medición más precisa. Mientras que los métodos de DNS y ferricianuro/arsenomolibdeno, indicaban valores más altos para la actividad, asociados a una sobreoxidación de D-fructosa, D-glucosa, leucrosa, y dextrano.

2. METODOLOGÍA DE LA EXPERIMENTACIÓN

La experimentación se desarrolló en el Laboratorio de Tecnología de Enzimas del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional - IBUN y en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad de La Salle, sede Norte en la Ciudad de Bogotá – Colombia, involucrando la ejecución de siete etapas:

- **ETAPA 1.** Caracterización del microorganismo.
- **ETAPA 2.** Banco activo y curva de calibración.
- **ETAPA 3.** Cinética de crecimiento.
- **ETAPA 4.** Evaluación de la fuente de nitrógeno.
- **ETAPA 5.** Evaluación de la fuente de carbono.
- **ETAPA 6.** Método de digestión y gravimetría para la cuantificación de la actividad enzimática aplicado a los 3 mejores ensayos.
- **ETAPA 7.** Análisis estadístico.

2.1 ETAPA 1. CARACTERIZACIÓN DEL MICROORGANISMO

La cepa *Leuconostoc mesenteroides* IBUN 34,1 fue suministrada por el Grupo de Tecnología de Enzimas del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional y criopreservada a -70°C en microtubos de 1,5mL hasta el desarrollo de la experimentación. El microorganismo *Leuconostoc mesenteroides* IBUN 34,1 fue caracterizado por medio de tinción de Gram (anexo 1) para verificar su morfología, pureza y para asegurar que no presentara contaminación. Para ello, se empleó el microscopio binocular 3292ZB.

2.2 ETAPA 2. BANCO ACTIVO Y CURVA DE CALIBRACIÓN

2.2.1 Banco activo. Una vez hecha la caracterización se procedió a realizar el banco activo con el vial entregado por el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (IBUN), siguiendo el protocolo establecido por el IBUN de banco activo para la cepa *Leuconostoc mesenteroides*, como se describe a continuación:

Se tomaron 250 μ L del microorganismo criopreservado en condiciones estériles y se adicionaron a 100mL del medio de cultivo estándar (tabla 3) en un Erlenmeyer de 250mL, esterilizado a 121°C durante 15 minutos (figura 1). Este cultivo se mantuvo en condiciones de agitación a 150rpm y temperatura de 30°C por 12h (inóculo).

Figura 1. Formulación estándar del medio de cultivo



Una vez obtenido el inóculo se adicionaron 5mL de éste a 95mL de medio de cultivo previamente estéril, se agitó un poco para homogenizar y se procedió a repartir la mezcla en 3 tubos falcón, que fueron sometidos a un proceso de centrifugación a 7.500rpm por 5min, desechando el sobrenadante y resuspendiendo el pellet de cada tubo, con 20mL de medio de cultivo fresco estéril, se homogenizaron en vortex y bajo condiciones asépticas en cabina de flujo laminar se realizó una sola mezcla en un beaker estéril (solución madre).

Posteriormente, se procedió a adicionar 800 μ L de esta solución madre en microtubos de 1,5mL previamente esterilizados que adicionalmente contenían 200 μ L de glicerol (trabajando en cámara de flujo laminar). Los microtubos fueron sometidos a un proceso de homogenización en vortex. Finalmente el banco activo fue almacenado en criopreservación a -70°C, hasta ser utilizados en ensayos posteriores.

Tabla 3. Medio de cultivo estándar

COMPONENTE	CANTIDAD*
Agua destilada (ml)	200
H ₃ PO ₄ (g)	2,76
Sacarosa (g)	12
Extracto de levadura (g)	2
MnSO ₄ (g)	0,004
MgSO ₄ (g)	0,008
FeSO ₄ (g)	0,008
CaCl ₂ (g)	0,028
KOH (g)	4

*Base de cálculo 200 mL

Fuente: IBUN (2006)

2.2.2 Curva de calibración. Para la cuantificación del peso seco, se elaboró una curva de calibración relacionándola con la absorbancia del medio leída a 600nm (anexo 2). Esta curva se elaboró con el objetivo de generar un instrumento que permitiera cuantificar la concentración de biomasa de los cultivos de manera indirecta, información que se requería para la etapa de evaluación del efecto de la sustitución parcial de la fuente de nitrógeno y de los cambios en la concentración de la fuente de carbono.

Para la realización de ésta curva de calibración se siguió el protocolo descrito en el anexo 2, establecido por Malagón (2007) de elaboración de la curva de calibración de *Leuconostoc mesenteroides*, realizando una fermentación durante 7 horas, y registrando la densidad óptica a 600nm en un espectrofotómetro Spectronic 20 genesys cada hora, las muestras se diluyeron en solución estéril en relación 1:10. Una vez medida la densidad óptica y la biomasa se realizó la curva de calibración (anexo 2), empleada en los posteriores ensayos de fuente de nitrógeno y fuente de carbono.

2.3 ETAPA 3. CINETICA DE CRECIMIENTO

Se realizó una curva de crecimiento cinético con el medio de cultivo estándar (100% extracto de levadura como fuente de nitrógeno y 6% de sacarosa como fuente de carbono) que involucró el tiempo y la biomasa con el fin de estandarizar los tiempos de detención en el crecimiento

exponencial, tenidos en cuenta para el momento de realizar los cultivos para las sustituciones de fuente de nitrógeno y variación en la fuente de carbono.

Siguiendo protocolos establecidos por el IBUN, se involucraron dos fases para el crecimiento del microorganismo; el inóculo y la fermentación. Para la preparación del inóculo, mediante condiciones estériles se adicionó a un erlenmeyer de 250mL con un volumen total de 100mL de medio de cultivo estéril, 250 μ L de la cepa *Leuconostoc mesenteroides* IBUN 34,1 (usando un vial del banco activo criopreservado a -70°C), sometiéndolo a condiciones de 150rpm y 30°C, al cual se le realizó una cinética de crecimiento haciendo un seguimiento cada hora a la densidad óptica durante 16 horas.

Para la preparación de la fermentación, una vez definido el tiempo en que se detendría el crecimiento del inóculo, se adicionaron mediante condiciones estériles 5mL de éste (preparación nueva deteniendo el crecimiento en el tiempo establecido) a un erlenmeyer de 250mL con un volumen total de 95mL de medio de cultivo estéril (llevando el volumen a 100mL), sometiéndolo a condiciones de 150rpm y 30°C, al cual se le realizó una cinética de crecimiento haciendo un seguimiento cada 30min a la densidad óptica durante 6 horas.

Dichos parámetros de tiempo se definieron teniendo en cuenta todas las fases de crecimiento (latencia, exponencial, estacionaria y muerte) de la cepa *Leuconostoc mesenteroides* IBUN 34. La biomasa se obtuvo por medio de la curva de calibración previamente realizada (anexo 2).

2.4 ETAPA 4. EVALUACIÓN DE LA SUSTITUCIÓN DE LA FUENTE DE NITRÓGENO

Como sustancias alternas al extracto de levadura, empleado como fuente de nitrógeno en el medio estándar, se evaluaron el dihidrógeno fosfato de amonio y la harina de soya, por sus características específicas y resultados positivos en experimentaciones anteriores hechas en el IBUN. Cada una de las fuentes de nitrógeno para cada uno de los niveles de sustitución establecidos (25, 50, 60 y 75%), se evaluó en unidades experimentales con un volumen de 200mL, por duplicado y teniendo en cuenta los dos procesos descritos en el apartado 2.3 (inoculo y fermentación).

La preparación de los medios descritos en la tabla 4 se realizó teniendo en cuenta que la proporción total de nitrógeno (entre el extracto de levadura y la fuente alterna) aportada fuera del 10% (0,2g de nitrógeno total). Para ello, se consideró que 1g de dihidrógeno fosfato de amonio aporta 0,1053g de nitrógeno y 1g de harina de soya aporta 0,1576g de nitrógeno, los cálculos completos se presentan en el anexo 3 para cada medio de cultivo.

Tabla 4. Composición de los medios de cultivo empleados y calculados para la evaluación de la fuente de nitrógeno

COMPONENTES*	HS: 25%	HS: 50%	HS: 60%	HS: 75%	DFA: 25%	DFA: 50%	DFA: 60%	DFA: 75%
Agua destilada (mL)	200	200	200	200	200	200	200	200
H ₃ PO ₄ (g)	2,76	2,76	2,76	2,76	2,76	2,76	2,76	2,76
Sacarosa (g)	12	12	12	12	12	12	12	12
Extracto de levadura (g)	1,5	1	0,8	0,5	1,5	1	0,8	0,5
Harina de soya (g)	0,32	0,63	0,76	0,95	-	-	-	-
Dihidrógeno fosfato de amonio (g)	-	-	-	-	0,24	0,47	0,57	0,71
MnSO ₄ (g)	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004
MgSO ₄ (g)	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008
FeSO ₄ (g)	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008
CaCl ₂ (g)	0,028	0,028	0,028	0,028	0,028	0,028	0,028	0,028
KOH (g)	4	4	4	4	4	4	4	4

*Base de cálculo 200 mL de medio. HS: Harina de soya. DFA: Dihidrógeno fosfato de amonio

Fuente: *componentes y composición según tabla 3

En la figura 2 se presentan las 4 formulaciones de los medios de cultivo con sustitución parcial de extracto de levadura por di-hidrogeno fosfato de amonio antes de esterilización, una vez finalizado el proceso de esterilización y finalizado el proceso de fermentación.

Figura 2. Formulaciones sustitución parcial de extracto de levadura por di-hidrogeno fosfato de amonio



En la figura 3 se presentan las 4 formulaciones de los medios de cultivo con sustitución parcial de extracto de levadura por harina de soya una vez finalizado el proceso de esterilización, una vez finalizado el proceso de activación y de fermentación.

Figura 3. Medios de cultivo estériles con la sustitución parcial de extracto de levadura por harina de soya



a. Medios de cultivo estériles



b. Medios de cultivo terminado el proceso de activación



c. Medios de cultivo terminado el proceso de fermentación

Con estos medios se desarrollaron las fermentaciones siguiendo lo descrito en el apartado 2.3 y pasado el tiempo establecido para el cultivo, se cuantificó la biomasa empleando la curva de peso seco (anexo 2) y se determinó la actividad enzimática, aplicando el protocolo descrito a continuación.

La determinación de la actividad enzimática se realizó por el método indirecto, para ello, las muestras obtenidas de la fermentación se centrifugaron a 7500rpm por 15min y al sobrenadante se le cuantificó la concentración de azúcares reductores por la técnica de Miller (anexo 4) y de glucosa mediante el kit Glucose-TR Spinreact (anexo 5). En la figura 4 se presenta el método de azúcares reductores (DNS), para la curva de calibración donde se evidencia la etapa en que se someten las muestras a ebullición y la etapa de dilución con agua fría.

Figura 4. Preparación de la curva de calibración para la cuantificación de azúcares reductores



a. Ebullición de muestras por 5min



b. Dilución de muestras con 5mL de agua destilada

2.5 ETAPA 5. EVALUACIÓN DE LOS CAMBIOS EN LA CONCENTRACIÓN DE LA FUENTE DE CARBONO

Para dar inicio a esta etapa, se seleccionaron las dos mejores sustituciones de fuente de nitrógeno (aquellas que permitieron alcanzar las actividades de transferencia más altas) y se procedió a determinar el efecto de la variación en la concentración de la fuente de carbono como factor independiente (niveles de variación: concentraciones de 5, 6, 7 y 8%), sobre la variable de respuesta: actividad enzimática (tabla 5).

Tabla 5. Sustituciones de la fuente de carbono evaluadas

Ensayo	% Sacarosa (p/v)	Sacarosa (g/100mL)
1	5	5
2	6	6
3	7	7
4	8	8

Para las fermentaciones se emplearon las condiciones descritas en el apartado 2.3., y éstas se desarrollaron por duplicado. En este caso, se repitió el procedimiento descrito en la evaluación de la sustitución de la fuente de nitrógeno para la cuantificación de la actividad enzimática (apartado 2.4), teniendo en cuenta las formulaciones seleccionadas.

2.6 ETAPA 6. APLICACIÓN DEL MÉTODO DE DIGESTIÓN Y GRAVIMETRÍA DEXTRANSACARASA / SACAROSA

Una vez obtenidos los resultados de la evaluación de las diferentes concentraciones de la fuente de carbono (sacarosa), se eligieron las 3 mejores, es decir aquellas que permitieron alcanzar las actividades enzimáticas de transferencia más altas, para aplicar el método de digestión y gravimetría dextran-sacarasa/sacarosa, con el fin de comparar esta metodología con el método indirecto empleado con anterioridad (método basado en la cuantificación de azúcares reductores y glucosa), el cual se realizó como se describe a continuación:

En un baño termostato se adicionaron 50mL de tampón fosfato pH5,5 y 16% sacarosa y se precalentaron a 30°C por 5min, posteriormente se adicionaron 50mL del extracto dextran-sacarasa (resultado del sobrenadante de la centrifugación de las muestras obtenidas a partir de la fermentación a 7500rpm por 15min). A partir del instante en que se adicionó la enzima, se tomaron alícuotas de 1mL de la reacción de digestión en los siguientes tiempos: 0, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70 y 80min, en tubos de ensayo, se inactivaron las muestras en agua hirviendo por 5min, se enfriaron en hielo y se refrigeraron en nevera a -4°C. La primera muestra (tiempo 0) se distribuyó en 12 microtubos cada uno con 500µL de muestra. A estas alícuotas se les añadió 1mL de etanol anhidrido frío, se centrifugaron durante 15min a 7500rpm. El sobrenadante se descartó y el precipitado se disolvió en 500µL de agua y 1mL de etanol anhidrido, se centrifugaron, se descartó el sobrenadante y se precipitó de nuevo con 1mL de etanol. Los precipitados se trataron tres veces con 1mL de acetona y una cuarta vez con 1mL de etanol anhidrido. Finalmente se dejaron secar las muestras en estufa a 60°C y se pesaron. Este mismo procedimiento se realiza con cada una de las muestras por duplicado (Helen, Mukerjea y Robyt, 2011).

2.7 ETAPA 7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis de varianza se realizó con el programa Minitab ® versión 17, a un nivel de confianza del 95%.

Para el caso de la fuente de nitrógeno, se consideraron dos factores de variación correspondientes al sustituto de la fuente estándar (dos niveles: harina de soya y dihidrógeno fosfato de amonio) y el porcentaje de sustitución (cinco niveles: 0 (medio estándar), 25, 50, 60 y 75%). Igualmente, se aplicó una prueba de Dunnet para comparar cada uno de los tratamientos con el patrón, que correspondía al medio estándar (100% extracto de levadura como fuente de nitrógeno y 6% de sacarosa como fuente de carbono).

En el caso de la evaluación de la fuente de carbono, se tenían dos factores de variación, el porcentaje de sacarosa en el medio (4 niveles: 5, 6, 7, 8 %) y el porcentaje de sustitución de extracto de levadura por dihidrógeno fosfato (2 niveles: 25 y 50%). Y se aplicó una prueba de Dunnet para comparar cada uno de los ensayos con el patrón que correspondía al medio estándar (100% extracto de levadura como fuente de nitrógeno y 6% de sacarosa como fuente de carbono).

Se presentan las siguientes hipótesis:

- Hipótesis nula: Todas las medias son iguales de la biomasa y la actividad enzimática de transferencia para todas las sustituciones no presentan diferencias significativas debido a la variación del factor evaluado.
- Hipótesis alterna: Por lo menos una media es diferente de alguna de las sustituciones evaluadas presenta biomasa y actividad enzimática de transferencia significativamente diferente a las demás debido a la variación del factor estudiado.

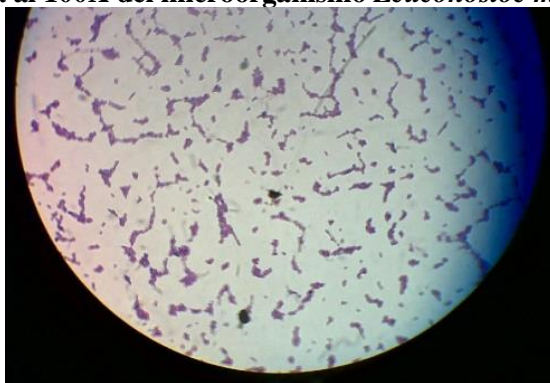
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se presentan los resultados obtenidos al realizar la evaluación de los cambios en la fuente de nitrógeno y la concentración de la fuente de carbono, sobre la producción de una enzima con actividad dextransacarasa a partir del cultivo de *Leuconostoc mesenteroides* IBUN 34,1 y la comparación de cada variación, con un blanco, que en este caso correspondió al medio de cultivo estándar: 100% extracto de levadura como fuente de nitrógeno y 6% de sacarosa como fuente de carbono.

3.1 IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO

La identificación del microorganismo se realizó como se expone en el apartado 2.1, evidenciando largas cadenas en forma cocoide Gram positivas y ausencia de contaminación, como se puede evidenciar en la figura 5, donde se presenta la vista microscopía del microorganismo en el aumento de 100X.

Figura 5. Vista microscópica al 100X del microorganismo *Leuconostoc mesenteroides* IBUN 34,1



3.2 CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *Leuconostoc mesenteroides* (IBUN 34,1)

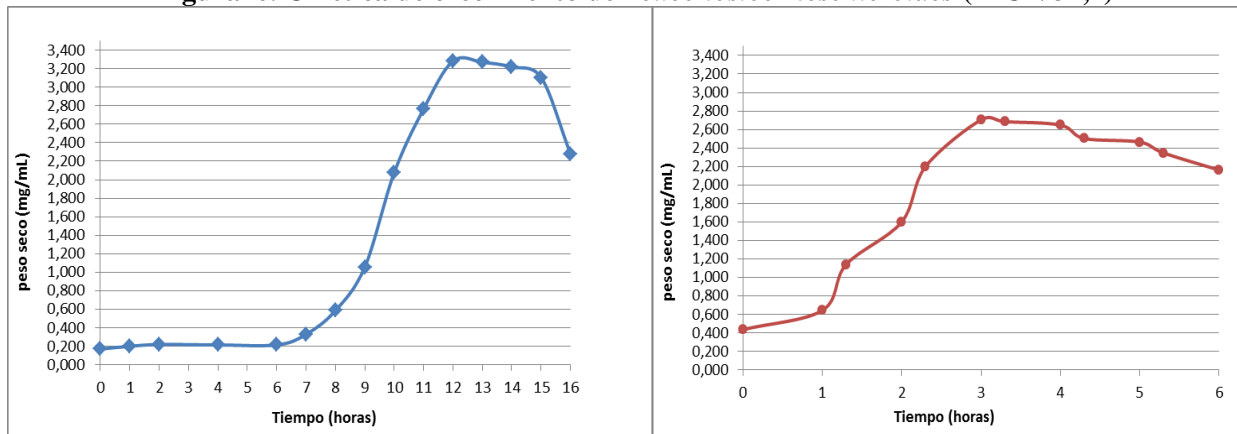
Se realizó el estudio de la cinética de crecimiento de este microorganismo, para determinar el tiempo en el que alcanzaba su fase exponencial y se debía detener la fermentación. Se definió mediante estos ensayos realizar la activación por 12h para la obtención del inóculo y tomar como tiempo para la fermentación 3h. En la tabla 6 se presenta el resumen de los datos, donde se calculó la biomasa con la ecuación de la curva de calibración para peso seco (anexo 2).

Tabla 6. Resumen de datos para cinética de crecimiento del inóculo y la fermentación

Inoculo			Fermentación		
Tiempo (h)	D.O. (600nm)	Biomasa (mg/mL)	Tiempo (h)	D.O. (600nm)	Biomasa (mg/mL)
0	0,036	0,169	0	0,090	0,437
1	0,042	0,199	1	0,132	0,645
2	0,046	0,219	1,3	0,232	1,140
4	0,045	0,214	2	0,325	1,601
6	0,045	0,214	2,3	0,446	2,200
7	0,068	0,328	3	0,548	2,705
8	0,120	0,585	3,3	0,544	2,685
9	0,215	1,056	4	0,537	2,648
10	0,421	2,076	4,3	0,507	2,504
11	0,560	2,765	5	0,499	2,465
12	0,665	3,284	5,3	0,475	2,346
13	0,663	3,272	6	0,438	2,162
14	0,652	3,220			
15	0,629	3,106			
16	0,462	2,279			

Comparando el crecimiento del microorganismo en las dos etapas involucradas en la producción de la enzima (inóculo y fermentación), En la figura 6 se evidencia una disminución en los tiempos de la cinética de crecimiento en la fermentación respecto al inóculo.

Figura 6. Cinética de crecimiento de *Leuconostoc mesenteroides* (IBUN 34,1)



a. Inóculo

b. Fermentación

Se puede observar, que en el inóculo, la fase de adaptación es lenta variando la concentración de biomasa de 0,169mg/mL a 0,214mg/mL durante las 6 primeras horas. Mientras que a partir de la hora 8, se presentó un aumento significativo del crecimiento indicando el inicio de la fase exponencial, para la cual se registra una variación de la biomasa desde 0,585mg/mL, hasta 3,284mg/mL a las 12h de cultivo. Con esta información se calculó la velocidad específica de

crecimiento que fue de $0,591\text{h}^{-1}$ (tabla 7). Después de las 12h empieza la fase estacionaria, que termina con la fase de muerte que inicia a partir de la hora 15. Rodríguez y Hanssen (2007), observaron una fase de adaptación con una duración de 6h, una fase logarítmica que se prolongó durante 7h, exhibiendo un rápido crecimiento y agotando parte de la sacarosa antes de entrar a la fase estacionaria desde la hora 14 hasta la 18, cuando observaron la zona de máximo consumo, mientras los metabolitos continuaban aumentando levemente en el medio. La máxima cantidad de biomasa obtenida fue de $4,2\text{g/L}$ después de 15h de fermentación. Tsuchiya et al., (1952) encontró un crecimiento similar utilizando un tiempo de residencia de 24h, donde la fase de adaptación fue de 6-8h en sustratos de piña y naranja. Florez (2014) encontró que el tiempo de adaptación en la fase de activación era de 12h con una generación máxima de biomasa de $1,81\text{ mg/mL}$ y una velocidad específica de crecimiento de $0,44\text{h}^{-1}$, que coincide con la hallada en la presente investigación en cuanto al comportamiento del inóculo en las 12 primeras horas de crecimiento (fase exponencial).

Con respecto a la curva de fermentación, la concentración inicial de biomasa fue más alta, $0,437\text{mg/mL}$ y se supera rápidamente la fase de adaptación (en la primera hora). También se aprecia que la fase exponencial finaliza a la hora 3 con una concentración de $2,705\text{mg/mL}$, para una velocidad específica de crecimiento en ésta fase de $1,03\text{h}^{-1}$ (tabla 7). La fase estacionaria se empieza a evidenciar a partir de la tercera hora y la fase de muerte a partir de la hora 4. Soler (2009) indica que los estudios cinéticos llevados a cabo en sus fermentaciones, presentaban una variación al inicio de los cultivos de la biomasa, entre $0,15$ y $0,33\text{mg/mL}$ para las diferentes condiciones (variación de aireación y agitación), y observó las etapas características del crecimiento microbiano, con una fase lag variable y corta -hasta de 1h-, una fase exponencial entre la hora 1 y 3, una de desaceleración desde la hora 3 y una estacionaria desde la hora 5, coincidiendo con los tiempos registrados en este trabajo, para la fermentación. Florez (2014) encontró que en el tiempo de adaptación de la fase de fermentación fue de 1h, con una máxima generación de biomasa de $2,29\text{mg/mL}$ y una velocidad específica de crecimiento de $1,16\text{h}^{-1}$.

Estas variaciones y comportamientos, son producto de la normalización de la actividad bioquímica del microorganismo disminuida por la exposición a la criopreservación, que le genera estrés metabólico (mecánico, térmico y osmótico) (Mukamolava, Kaprelyants, Kell y Young, 2003).

Tabla 7. Parámetros cinéticos de crecimiento de *Leuconostoc mesenteroides* IBUN 34,1 en las etapas de obtención de inóculo y fermentación

Etapa	Tiempo de adaptación (h)	Biomasa máxima (mg/mL)	Velocidad específica de crecimiento μ (h^{-1})
Inoculo	12	3,284	0,591
Fermentación	3	2,705	1,030

3.3 EVALUACIÓN DE FUENTE DE NITRÓGENO

A continuación se presentan los resultados obtenidos para los ensayos correspondientes a la sustitución del extracto de levadura como fuente de nitrógeno por las fuentes alternas, dihidrogeno fosfato de amonio y harina de soya para los niveles de sustitución (0, 25, 50, 60 y 75%).

3.3.1 Sustitución de extracto de levadura por dihidrógeno fosfato de amonio. En la tabla 8 se reporta el resumen de datos obtenidos para la sustitución de la fuente de nitrógeno por dihidrógeno fosfato de amonio, en los 5 niveles de sustitución evaluados para la variable de respuesta biomasa.

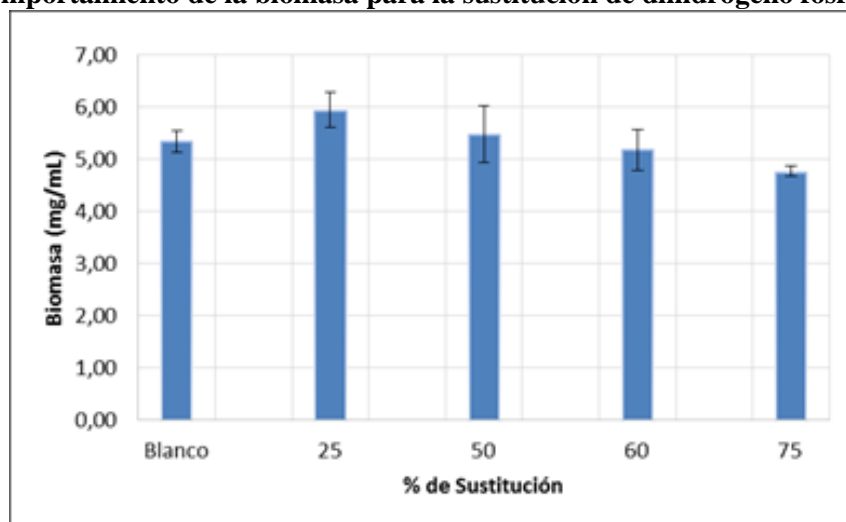
En la figura 7, puede observarse que existe una tendencia a que la biomasa disminuya como consecuencia del incremento en la sustitución del extracto de levadura por dihidrógeno fosfato de amonio, pasando de 5,93mg/mL para una sustitución del 25% a 4,76mg/mL cuando la sustitución era del 75%. Con respecto al medio estándar que presentó un biomasa de 5,34mg/mL, puede observarse en la tabla 8 que con las sustituciones de 25 y 50% se obtiene una cantidad de biomasa superior siendo éstas de 5,93mg/mL y 5,46mg/mL respectivamente, lo que evidencia que no existen diferencias significativas entre algunas sustituciones de fuente de nitrógeno con respecto al control (medio estándar), teniendo en cuenta la desviación, presentando un comportamiento muy similar, a diferencia de la muestra que contiene 75% de dihidrógeno fosfato de amonio y 25% de extracto de levadura que tiene una biomasa de 4,77 mg/mL, siendo inferior con respecto a la tendencia de las demás.

Tabla 8. Densidad óptica y biomasa al término de la fermentación para las diferentes sustituciones de extracto de levadura por dihidrógeno fosfato de amonio

Porcentaje de Sustitución*	Densidad Óptica fermentación (nm)	Biomasa (mg/mL)	Promedio Biomasa (mg/mL)	Desviación biomasa
Medio estándar 0%	1,108	5,50	5,34	0,20
	1,051	5,21		
25%	1,246	6,18	5,93	0,33
	1,152	5,71		
50%	1,180	5,85	5,46	0,54
	1,027	5,10		
60%	1,101	5,46	5,17	0,39
	0,989	4,91		
75%	0,95	4,71	4,77	0,10
	0,971	4,82		

*El porcentaje de sustitución es la cantidad de extracto de levadura reemplazada por dihidrogeno fosfato de amonio (de acuerdo a los calculos presentados en el anexo 3)

Figura 7. Comportamiento de la biomasa para la sustitución de dihidrógeno fosfato de amonio.



De acuerdo al análisis de varianza ANOVA y la prueba de Dunnet presentados en la sección a del anexo 10, realizados para evaluar los 4 niveles de sustitución para la fuente alterna de nitrógeno por dihidrógeno fosfato de amonio (25, 50, 60 y 75%), en comparación con el control (medio estándar, nivel de sustitución del 0%), se observa que para la variable de respuesta: biomasa, no existen diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0,05$), rechazando la hipótesis alterna, evidenciándose en la tabla 9 que todas las formulaciones comparten la misma letra de agrupación.

Tabla 9. Comparación múltiple de Dunnett con el control (medio estándar 0% de sustitución de la fuente de nitrógeno) para las sustituciones del extracto de levadura por dihidrógeno fosfato de amonio para la obtención de biomasa

%sustitución	N	Media	Agrupación
1 (control)	2	5,340	A
2 (25%)	2	5,930	A
3 (50%)	2	5,460	A
4 (60%)	2	5,165	A
5 (75%)	2	4,7650	A

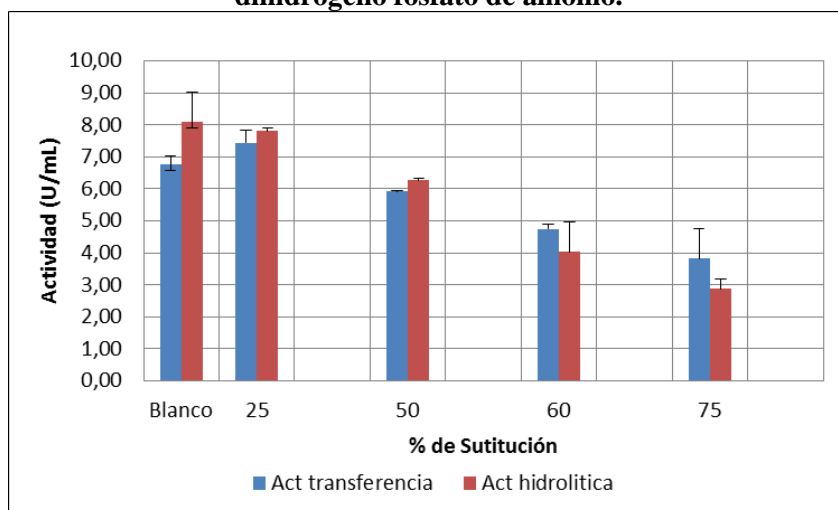
En la tabla 10 se reporta el resumen de datos obtenidos para la sustitución de la fuente de nitrógeno por dihidrógeno fosfato de amonio, en los 5 niveles de sustitución evaluados para la variable de respuesta: actividad enzimática de transferencia, en la figura 8, se observa que la actividad enzimática de transferencia pasó de 7,44U/mL a 3,82U/mL, disminuyendo a medida que el nivel de sustitución del extracto de levadura por dihidrógeno fosfato de amonio era más alto. Esto coincide con lo reportado por Vanegas (2006) quienes encontraron que a medida que se disminuía la cantidad de extracto de levadura en el medio, la enzima obtenida poseía una menor actividad enzimática de transferencia, ya que cuando en el medio se aportaba solo el 25% de dihidrógeno fosfato de amonio, pasaban de 5.84U/mL a 1.65U/mL cuando el aporte de dihidrógeno fosfato de amonio era del 75%.

Tabla 10. Actividad enzimática al término de la fermentación para las diferentes sustituciones de extracto de levadura por dihidrógeno fosfato de amonio

Porcentaje de Sustitución*	Actividad de transferencia (U/mL)	Desviación estándar	Actividad hidrolítica (U/mL)	Desviación estándar
Medio Estándar	6,77	0,26	8,10	0,21
25/75	7,44	0,39	7,80	0,11
50/50	5,92	0,04	6,27	0,06
60/40	4,75	0,16	4,04	0,44
75/25	3,82	0,44	2,88	0,31

*El porcentaje de sustitución es dihidrogeno fosfato de amonio vs levadura

Figura 8. Comportamiento de la actividad enzimática de transferencia con sustitución de dihidrógeno fosfato de amonio.



De acuerdo al análisis de varianza ANOVA presentado en la sección c del anexo 10, realizado para evaluar los 4 niveles de sustitución para la fuente alterna de nitrógeno por dihidrógeno fosfato de amonio (25, 50, 60 y 75%), en comparación con el control (medio estándar, nivel de sustitución del 0%), se observa que para la variable de respuesta: actividad enzimática, existen diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$). Al aplicar la prueba de Dunnett se acepta la hipótesis alterna, evidenciándose en la tabla 11 que las formulaciones correspondientes al 60 y 75% de sustitución, al no compartir la misma letra de agrupación son significativamente diferentes con respecto al control, presentando una actividad enzimática de transferencia inferior.

Tabla 11. Comparación múltiple de Dunnett con el control (medio estándar 0% de sustitución de la fuente de nitrógeno) para las sustituciones del extracto de levadura por dihidrógeno fosfato de amonio en cuanto a la actividad enzimática de transferencia obtenida

%sustitución	N	Media	Agrupación
1 (control)	2	6,775	A
2 (25%)	2	7,435	A
3 (50%)	2	5,9150	A
4 (60%)	2	4,745	
5 (75%)	2	3,815	

Analizando los resultados obtenidos, se establece entonces que en la evaluación de las sustituciones parciales de extracto de levadura por dihidrógeno fosfato de amonio, la sustitución del 25% presenta una actividad enzimática de transferencia de 7,44U/mL mayor a la actividad enzimática de transferencia registrada para el medio estándar (100% extracto de levadura) que fue de 6,77U/mL,

convirtiendo esta sustitución en una alternativa viable para el proceso, puesto que permitiría disminuir los costos asociados al medio de cultivo y mejorar los rendimientos del proceso.

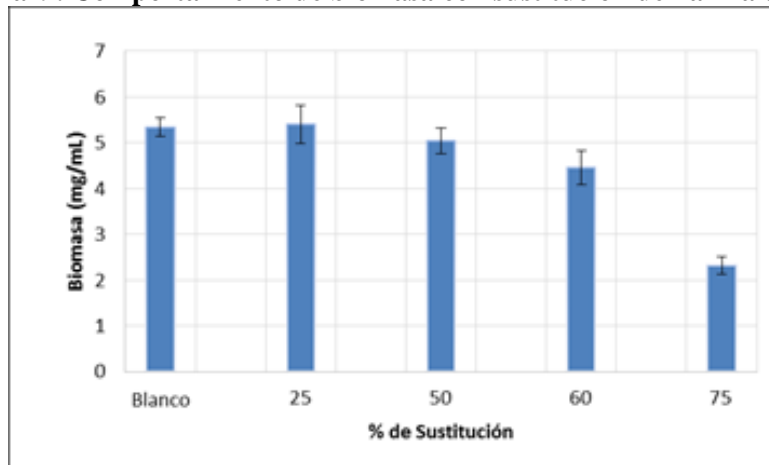
3.3.2 Sustitución parcial de extracto de levadura por harina de soya. En la tabla 12 se reporta el resumen de datos obtenidos para la sustitución de la fuente de nitrógeno por harina de soya, en los 5 niveles de sustitución evaluados (0, 25, 50, 60 y 75%) correspondientes a la concentración de biomasa alcanzada luego de la fermentación para cada tratamiento. En la figura 9, se evidencia que las lecturas de densidad óptica son directamente proporcionales con los resultados obtenidos para biomasa.

Tabla 12. Densidad óptica y biomasa al término de la fermentación para las diferentes sustituciones de extracto de levadura por harina de soya

Porcentaje de Sustitución*	Densidad Óptica fermentación (nm)	Biomasa (mg/mL)	Promedio Biomasa (mg/mL)	Desviación biomasa
Medio estándar	1,108	5,50	5,34	0,20
	1,051	5,21		
25/75	1,029	5,11	5,40	0,42
	1,148	5,69		
50/50	0,976	4,84	5,04	0,28
	1,057	5,24		
60/40	0,95	4,71	4,45	0,37
	0,845	4,19		
75/25	0,441	2,19	2,32	0,19
	0,494	2,46		

*El porcentaje de sustitución es harina de soya vs levadura

Figura 9. Comportamiento de biomasa con sustitución de harina de soya



De acuerdo al análisis de varianza ANOVA presentado en la sección b del anexo 10, realizado para evaluar los 4 niveles de sustitución para la fuente alterna de nitrógeno por harina de soya (25, 50, 60 y 75%), en comparación con el control (medio estándar, nivel de sustitución del 0%), se observa que para la variable de respuesta: biomasa, existen diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$). Al aplicar la prueba de Dunnett se acepta la hipótesis alterna, evidenciándose en la tabla 13 que la formulación del 75%, al no compartir la misma letra de agrupación es significativamente diferente con respecto al control, presentando una biomasa inferior.

Tabla 13. Comparación múltiple de Dunnett con un control (medio estándar 0% de sustitución de la fuente de nitrógeno) para las sustituciones del extracto de levadura por harina de soya en cuanto a la obtención de biomasa

%sustitución	N	Media	Agrupación
1 (control)	2	5.340	A
2 (25%)	2	5.385	A
3 (50%)	2	5.030	A
4 (60%)	2	4.440	A
5 (75%)	2	2.310	

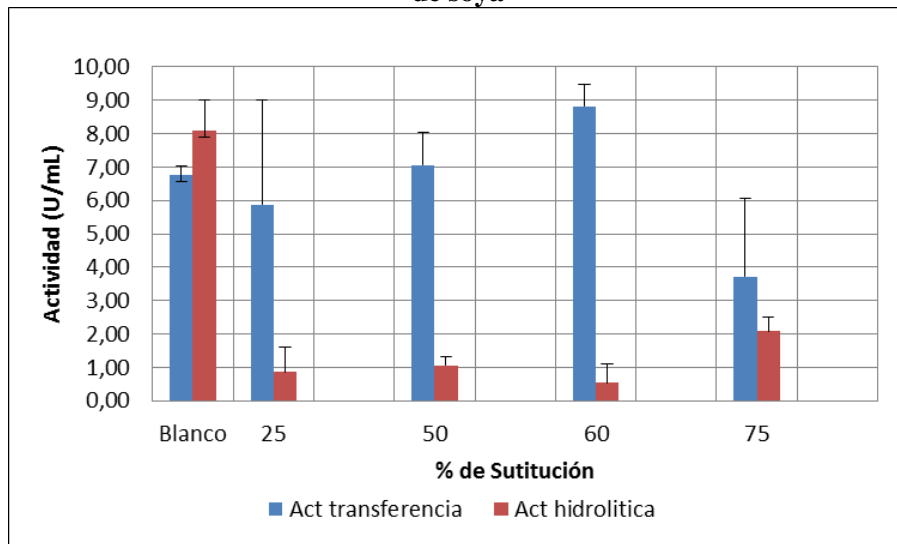
Continuando con el análisis en la tabla 14 se reporta el resumen de datos obtenidos para la sustitución de la fuente de nitrógeno por harina de soya en los 5 niveles evaluados (0, 25, 50, 60 y 75%) para la variable de respuesta actividad enzimática de transferencia en la figura 10, se observan las actividades enzimáticas alcanzadas por los tratamientos.

Tabla 14. Actividad enzimática de transferencia al término de la fermentación para las diferentes sustituciones de extracto de levadura por harina de soya

Porcentaje de Sustitución*	Actividad de transferencia (U/mL)	Desviación estándar	Actividad hidrolítica (U/mL)	Desviación estándar
Medio Estándar	6,77	0,26	8,10	0,91
25/75	5,88	3,12	0,87	0,73
50/50	7,06	0,98	1,05	0,25
60/40	8,82	0,66	0,53	0,58
75/25	3,71	2,35	2,09	0,42

*El porcentaje de sustitución es harina de soya vs levadura

Figura 10. Comportamiento de la actividad enzimática de transferencia con sustitución de harina de soya



Con respecto a la harina de soya como sustituyente, ésta presentó una precipitación muy marcada en el medio debido a sus características físicas (figura 11) que causó interferencia en la medición de biomasa y actividad enzimática. Por esa razón, aunque los valores de actividad de transferencia superan el valor registrado para el medio estándar (6,77 U/mL), la actividad hidrolítica es muy baja, indicando que posiblemente la actividad de transferencia no represente adecuadamente las condiciones alcanzadas y haya sido sobrevalorada, tal y como se presenta en la figura 11. En ese sentido, en los ensayos para evaluar las variaciones en la fuente de carbono no se consideró pertinente continuar utilizando la harina de soya como sustituyente parcial de la fuente de nitrógeno.

Figura 11. Medios de cultivo con sustitución parcial de harina de soya



Esto coincide con lo observado por Chewing, Nieto, Atehortúa y Sepúlveda (2012) cuando trabajaron con harina de soya y glicerol para la síntesis de un tipo particular de estatina. Pues ellos observaron precipitación en sus medios de cultivo, cuando la suplementación la realizaron con harina de soya desgrasada, sin adición de glicerol como fuente carbono extra, lo que también provocó que la biosíntesis se dirigiera a la producción de mevastatina. Igualmente, Manzoni, Bergomi, Rollini y Cavazzoni (1999) infirieron en su trabajo, que debido al efecto de la fracción lipídica de la harina de soya completa, la biomasa y la actividad enzimática alcanzadas, se vieron influenciadas por la baja solubilidad de este compuesto en el medio de cultivo.

De acuerdo al análisis de varianza ANOVA y la prueba de Dunnet presentados en la sección d del anexo 10, realizados para evaluar los 4 niveles de sustitución para la fuente alterna de nitrógeno por harina de soya (25, 50, 60 y 75%), en comparación con el control (medio estándar, nivel de sustitución del 0%), se observa que para la variable de respuesta: actividad enzimática de transferencia, no existen diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0,05$), rechazando la hipótesis alterna, evidenciándose en la tabla 15 que todas las formulaciones comparten la misma letra de agrupación.

Tabla 15. Comparación múltiple de Dunnet con un el control (medio estándar 0% de sustitución de la fuente de nitrógeno) para las sustituciones del extracto de levadura por harina de soya en cuanto a la actividad enzimática de transferencia obtenida

%sustitución	N	Media	Agrupación
1 (control)	2	6,775	A
2 (25%)	2	8,820	A
3 (50%)	2	7,060	A
4 (60%)	2	5,88	A
5 (75%)	2	3,71	A

3.4 EVALUACIÓN DE FUENTE DE CARBONO.

Considerando los resultados de la evaluación de las fuentes de nitrógeno, en esta etapa se evaluó la variación en la fuente de carbono en 5, 6, 7 y 8% para medios con sustitución del extracto de levadura por dihidrogeno fosfato de amonio en los niveles de 25 y 50% (los que permitieron alcanzar una actividad enzimática de transferencia mayor que la alcanzada con el medio estándar). Los resultados de esta evaluación se presentan en la tabla 16.

Tabla 16. Biomasa y actividad enzimática para las diferentes concentraciones de la fuente de carbono

Fuente de Nitrógeno	% de Sacarosa en el Medio	Biomasa (mg/mL)	Actividad de transferencia (U/mL)	Actividad hidrolítica (U/mL)
EL* 100%	6	5,34	6,77	8,10
DHFA** 25%	5	5,35	7,79	8,70
DHFA** 25%	6	5,48	6,00	6,55
DHFA** 25%	7	5,39	1,85	3,08
DHFA** 25%	8	5,32	1,14	1,94
DHFA** 50%	5	5,30	4,45	5,52
DHFA** 50%	6	5,62	4,92	5,16
DHFA** 50%	7	5,14	2,06	4,16
DHFA** 50%	8	5,24	0,77	1,15

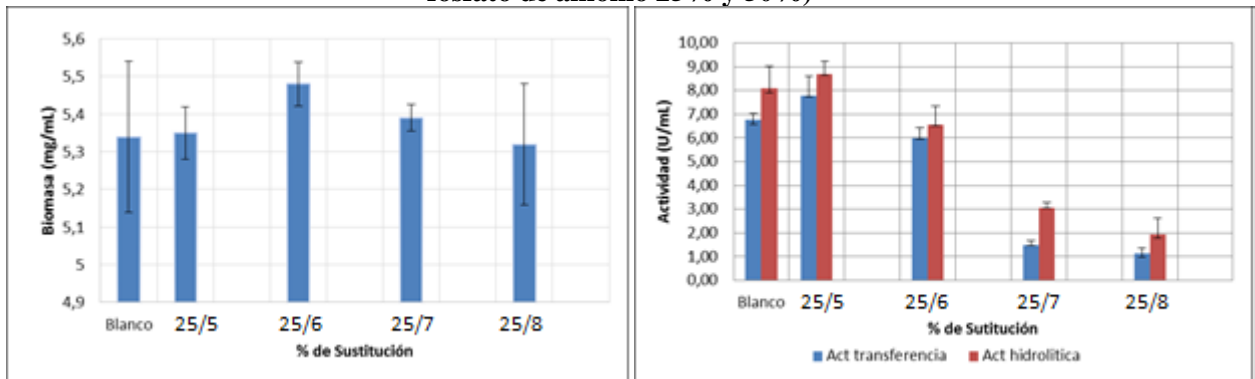
*EL: extracto de levadura, DHFA**: Dihidrógeno Fosfato de Amonio

La máxima actividad se logró empleando un 5% de fuente de carbono y con la sustitución del extracto de levadura por dihidrógeno fosfato de amonio de 25%, con actividad de transferencia de 7,79U/mL y actividad hidrolítica de 8,70U/mL, superando la actividad de transferencia de 6,77U/mL y la actividad hidrolítica de 8,10U/mL alcanzadas con el medio estándar. Se presentó una disminución por exceso de sustrato al aumentar la concentración de sacarosa a niveles de 8g/mL evidenciándose una actividad máxima de transferencia de 1,14U/mL y actividad hidrolítica de 1,94U/mL con la sustitución del extracto de levadura por dihidrogeno fosfato en 25% .

En la figura 12, se observa que para las formulaciones con el mayor porcentaje de sustitución de fuente de nitrógeno y la mayor concentración de la fuente de carbono, presentaron una disminución importante en la actividad, ya que con una sustitución del 50% de extracto de levadura por dihidrogeno fosfato de amonio y la concentración de 5% de sacarosa, se obtuvo una actividad de transferencia de 4,45U/mL y una actividad hidrolítica de 5,52U/mL, siendo menor a la reportada con respecto a la sustitución del 25% de extracto de levadura por dihidrogeno fosfato de amonio y la misma concentración de sacarosa. Con la sustitución del 50% de extracto de levadura por dihidrógeno fosfato de amonio y una concentración de sacarosa de 8% se obtuvo una actividad de transferencia de 0,77U/mL y actividad hidrolítica de 1,15U/mL disminuyendo casi en un 83% y 79% con respecto a la sustitución del 50% de extracto de levadura por dihidrogeno fosfato de amonio y una concentración de 5% de sacarosa. Vanegas (2006) encontró que la actividad

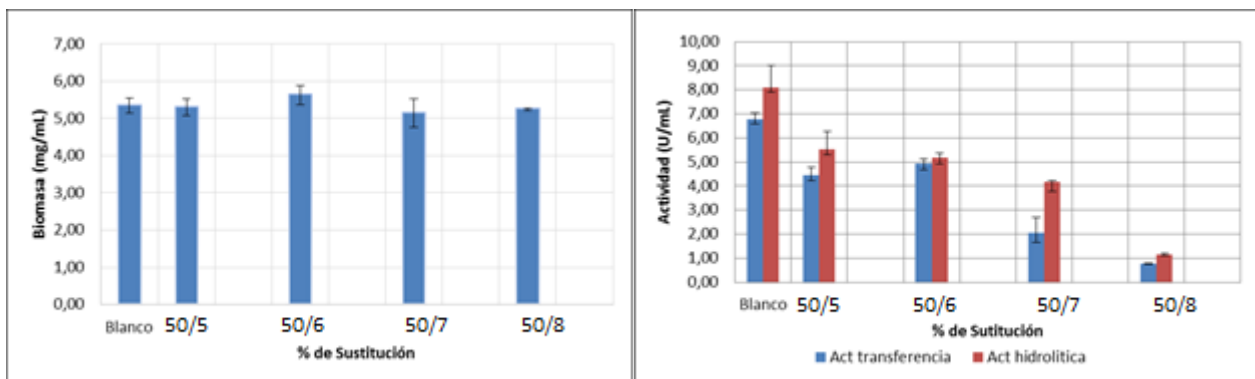
enzimática obtenida, para sustituciones del extracto de levadura por fuentes orgánicas de nitrógeno, disminuye a medida que el nivel de sustitución se incrementa. Florez (2014) reportó que estas sustituciones también afectan la obtención de biomasa, debido a que el crecimiento del microorganismo se ve afectado como consecuencia de dos características fundamentales: la disponibilidad del sustrato para las actividades metabólicas y el cambio reológico del medio.

Figura 12. Variación de la fuente de carbono en las mejores fuentes de nitrógeno (dihidrógeno fosfato de amonio 25% y 50%)



a. Biomasa con fermentación de 25% de dihidrógeno fosfato de amonio (mg/mL).

b. Actividad enzimática de transferencia con 25% de dihidrógeno fosfato de amonio (mg/mL).



c. Biomasa con fermentación de 50% de dihidrógeno fosfato de amonio (mg/mL).

d. Actividad enzimática de transferencia con 50% de dihidrógeno fosfato de amonio (mg/mL).

Se realizó un análisis de varianza ANOVA y prueba de Dunnett para evaluar los 4 niveles de variación en la concentración de la fuente de carbono (5, 6, 7 y 8%), en comparación con el control (100% extracto de levadura como fuente de nitrógeno y 6% de sacarosa como fuente de carbono) para cada uno de los ensayos correspondientes a las formulaciones del 25 y 50% de sustitución de

fuerza de nitrógeno por dihidrógeno fosfato de amonio aplicados a las dos variables de respuesta; biomasa y actividad enzimática de transferencia, presentados a continuación:

De acuerdo al análisis de varianza ANOVA y la prueba de Dunnett presentados en la sección a del anexo 11 correspondiente a la formulación del 25% (de sustitución de fuerza de nitrógeno por dihidrógeno fosfato de amonio), se observa que para la variable de respuesta: biomasa, no existen diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0,05$), rechazando la hipótesis alterna, evidenciándose en la tabla 17 que todas las formulaciones comparten la misma letra de agrupación.

Tabla 17. Comparación múltiple de Dunnett con un control (medio estándar 0% de sustitución de la fuerza de nitrógeno) para la formulación de sustitución del 25% de fuerza de nitrógeno por dihidrógeno fosfato de amonio en cuanto a la obtención de biomasa

%sustitución	N	Media	Agrupación
1 (control)	2	5,340	A
2 (5%)	2	5,4600	A
3 (6%)	2	5,3750	A
4 (7%)	2	5,3300	A
5 (8%)	2	5,300	A

De acuerdo al análisis de varianza ANOVA presentado en la sección c del anexo 11, correspondiente a la formulación del 25% (de sustitución de fuerza de nitrógeno por dihidrógeno fosfato de amonio), se observa que para la variable de respuesta: actividad enzimática de transferencia, existen diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$). Al aplicar la prueba de Dunnett se acepta la hipótesis alterna, evidenciándose en la tabla 18 que las formulaciones del 7 y 8%, al no compartir la misma letra de agrupación son significativamente diferentes con respecto al control, presentando una actividad enzimática de transferencia inferior.

Tabla 18. Comparación múltiple de Dunnett con un control (medio estándar 0% de sustitución de la fuerza de nitrógeno) para la formulación de sustitución del 25% de fuerza de nitrógeno por dihidrógeno fosfato de amonio en cuanto a la actividad enzimática de transferencia obtenida

%sustitución	N	Media	Agrupación
1 (control)	2	6,775	A
2 (5%)	2	7,785	A
3 (6%)	2	5,995	A
4 (7%)	2	1,850	
5 (8%)	2	1,140	

De acuerdo al análisis de varianza ANOVA y la prueba de Dunnett presentados en la sección b del anexo 11 correspondiente a la formulación del 50% (de sustitución de fuente de nitrógeno por dihidrógeno fosfato de amonio), se observa que para la variable de respuesta: biomasa, no existen diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0,05$), rechazando la hipótesis alterna, evidenciándose en la tabla 19 que todas las formulaciones comparten la misma letra de agrupación.

Tabla 19. Comparación múltiple de Dunnett con un control (medio estándar 0% de sustitución de la fuente de nitrógeno) para la formulación de sustitución del 50% de fuente de nitrógeno por dihidrógeno fosfato de amonio en cuanto a la obtención de biomasa

%sustitución	N	Media	Agrupación
1 (control)	2	5,340	A
2 (5%)	2	5,605	A
3 (6%)	2	5,295	A
4 (7%)	2	5,2200	A
5 (8%)	2	5,115	A

De acuerdo al análisis de varianza ANOVA presentado en la sección d del anexo 11, correspondiente a la formulación del 50% (de sustitución de fuente de nitrógeno por dihidrógeno fosfato de amonio), se observa que para la variable de respuesta: actividad enzimática de transferencia, existen diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$). Al aplicar la prueba de Dunnett se acepta la hipótesis alterna, evidenciándose en la tabla 20 que todos los tratamientos al no compartir la misma letra de agrupación con respecto al control, son significativamente diferentes de éste, presentando una actividad enzimática de transferencia inferior.

Tabla 20. Comparación múltiple de Dunnett con un control (medio estándar 0% de sustitución de la fuente de nitrógeno) para la formulación de sustitución del 50% de fuente de nitrógeno por dihidrógeno fosfato de amonio en cuanto a la actividad enzimática de transferencia obtenida

%sustitución	N	Media	Agrupación
1 (control)	2	6,775	A
2	2	4,920	
3	2	4,450	
4	2	2,055	
5	2	0,7700	

3.5 EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD CON EL MÉTODO DE DIGESTIÓN Y GRAVIMETRÍA DEXTRANSACARASA/SACAROSA

En la tabla 21 se presentan los resultados obtenidos al evaluar por el método de digestión y gravimetría dextran-sacarasa/sacarosa las muestras con sustitución del extracto de levadura por dihidrógeno fosfato de amonio en un 25% y con variaciones en la fuente de carbono de 5 y 6% de sacarosa, debido a que estas fueron las que permitieron alcanzar una mayor actividad enzimática de transferencia medida por el método indirecto. Adicionalmente se evaluó por este método la actividad enzimática de transferencia de la muestra con sustitución del extracto de levadura por dihidrógeno fosfato de amonio en 50% y 5% de concentración de sacarosa.

Tabla 21. Actividad enzimática obtenida con el método de digestión y gravimetría dextran-sacarasa/sacarosa

Porcentaje de Sustitución*	Actividad (U/mL)
25/5	11,45
25/6	11,94
50/5	6,46

*Dihidrógeno fosfato de amonio/ sacarosa

El método de digestión y gravimetría dextran-sacarasa/sacarosa se aplicó como un método alternativo para verificar la actividad enzimática en el medio de cultivo con *Leuconostoc mesenteroides*. Al comparar las actividades obtenidas por el método de digestión y gravimetría correspondientes a las formulaciones del 25% de sustitución del extracto de levadura con variaciones en la fuente de carbono con 5 y 6% de sacarosa, se evidencia que para el segundo caso (25% de dihidrógeno fosfato de amonio y 6% de sacarosa) la actividad es más alta siendo ésta de 11,94U/mL que para el primero (25% de dihidrógeno fosfato de amonio y 5% de sacarosa) de 11,45U/mL, lo cual difiere con lo obtenido por el método indirecto, ya que para la formulación del 25% de sustitución con variación del 5% en la fuente de carbono la actividad fue más alta siendo ésta de 7,79U/mL, en comparación a la obtenida con la formulación del 25% de sustitución con variación del 6% en la fuente de carbono que fue de 6,00U/mL.

Este método no funcionó para hacer el comparativo con el método indirecto, debido a que la forma establecida para su ejecución permite errores que repercuten directamente en el resultado

En el anexo 12, se presenta el resumen de resultados obtenidos y los cálculos correspondiente a la actividad para cada uno de los ensayos evaluados. En la figura 13 se puede observar la reunión del polímero obtenido al finalizar los ensayos por el método de digestión y gravimetría una vez medidos y registrados los pesos.

Figura 13. Obtención de polímero por método de digestión y gravimetría dextran-sacarasa/sacarosa



CONCLUSIONES

- En el crecimiento de *Leuconostoc mesenteroides*, la activación, presentó una fase de adaptación lenta de aproximadamente 6 horas y alcanzando a las 12 horas un máximo de producción de biomasa de 3,284mg/mL, lo que correspondió a una velocidad específica de crecimiento durante la fase exponencial de $0,591\text{h}^{-1}$. Mientras que durante los ensayos correspondientes a la fermentación, ésta fue de aproximadamente 3 horas y el máximo de concentración de biomasa fue de 2,705 mg/mL para una velocidad específica de crecimiento durante la fase exponencial de $1,03\text{h}^{-1}$.
- Con los cambios en la fuente de nitrógeno, fue posible obtener biomazas y actividades mayores a las reportadas con el medio estándar a partir de *Leuconostoc mesenteroides* con una sustitución del 25% de dihidrógeno fosfato de amonio y 75% de extracto de levadura. Sin embargo estas actividades mayores, no logran ser estadísticamente diferentes de las alcanzadas con el medio estándar.
- La sustitución total de extracto de levadura por fuentes orgánicas alternas (harina de soya y dihidrógeno fosfato de amonio), no es pertinente para el cultivo de *Leuconostoc mesenteroides*, debido a que el crecimiento reportado en biomasa y actividad enzimática disminuye significativamente con respecto al medio estándar.
- La mejor actividad enzimática con la sustitución de la fuente de carbono se obtuvo con 25% de dihidrógeno fosfato de amonio y 5% de sacarosa superando al medio estándar (medio de cultivo 100% de extracto de levadura y 6% de sacarosa). Sin embargo la actividad reportada no logra ser estadísticamente diferente a la alcanzada con el medio estándar.
- La harina de soya no funcionó como una alternativa para sustituir parcialmente el extracto de levadura en el medio de cultivo, puesto que por sus propiedades físicas, presentó una insolubilidad, que interfirió en la medida de la biomasa y en la cuantificación de la actividad enzimática a pesar de que el microorganismo presentó un crecimiento notable en el medio.

- Por medio del método de digestión y gravimetría dextransacarasa/sacarosa, se obtuvieron actividades enzimáticas más altas que las calculadas por el método indirecto, evidenciándose que para las sustituciones del 25% de extracto de levadura por dihidrógeno fosfato de amonio y con concentraciones de sacarosa del 5 y 6%, el aumento en dicha actividad fue de 32% y 50% respectivamente.

RECOMENDACIONES

- Con el fin de facilitar el proceso de obtención de la enzima, es pertinente hacer el seguimiento a los reactivos que se van a emplear en el medio de cultivo de *Leuconostoc mesenteroides* evaluando el orden de agregación, la solubilidad y el pH adecuado, para que dichos factores no afecten en el crecimiento óptimo del microorganismo.
- Evaluar la producción de dextranos con los extractos enzimáticos obtenidos, con el fin de observar la pureza y sus posteriores aplicaciones y evaluaciones en matrices alimentaria.
- La presente investigación amplía la posibilidad de explorar otras fuentes de nitrógeno orgánicas e inorgánicas para el crecimiento de *Leuconostoc mesenteroides* y de esta manera incrementar la actividad enzimática, en ese sentido se sugiere trabajar con fuentes como suero lácteo, harina de arroz, harina de trigo, nitratos y desechos frutales como sustitutos parciales de extracto de levadura dados sus componentes y amplias investigaciones.
- Debido a que con las fuentes de nitrógeno inorgánicas como el dihidrógeno fosfato de amonio, *Leuconostoc mesenteroides* presentó comportamientos factibles de actividad enzimática, esta sustitución es una alternativa viable para el proceso puesto que permitiría disminuir los costos asociados al medio de cultivo empleado actualmente (100% extracto de levadura), adicional a esto al obtener mejores resultados disminuyendo la concentración de la fuente de carbono a 5% (medio estándar 6%), la industria alimentaria debería explorar con más detenimiento este campo ya que abre la posibilidad de mejorar los rendimientos económicos del proceso.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Libros

Badui, S. (2006). *Química de Alimentos*. (4ª ed.) México: Pearson Educación.

Devlin, T. M. (1999). *Bioquímica – libro de texto con aplicaciones clínicas*. (3ª ed.) Barcelona: Editorial Revert S.A.

Gil, A. (2010). *Tratado de nutrición: Composición y calidad nutritiva de los alimentos*. (Tomo II). España: Panamericana.

García, G., Quintero, R. y López, M. (2004). *Biotecnología alimentaria*. México: Editorial Limusa

IBUN. (2006). *Protocolos de laboratorio del laboratorio de tecnología de enzimas del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.

Malagón, D. H. (2007). *Biosíntesis y caracterización de polímeros biodegradables del tipo PHAs*. Manual de procedimientos – producción de polihidroxialcanoatos (PHAs).

Negróni, M. (2009). *Microbiología estomatológica – fundamentos y guía práctica*. (2ª ed.) Argentina: Editorial Médica Panamericana.

Sneath, P., Mair, N., Sharpe, M. y Holt, J. (1986). *Bergey's: Manual of Systematic Bacteriology*. (Vol. 2) USA: Williams and Wilkins.

Sneath, P., Staley, J., Brenner, D., Holt, J., Castenholz, R., Schleifer, K., Tully, J., Ursing, J. y Williams, S. (1991). *Bergey's: Manual of Determinative Bacteriology*. (9ª ed.) USA: Williams and Wilkins.

Revistas – Artículos

Corzo, N., Alonso, J. L., Azpiroz, F., Calvo, M. A., Cirici, M., Leis, R., Lombó, F., Mateos, I., Plou, F., Madiedo, P., Rúperez, P., Redondo, A., Sanz, M. L., Clemente, A. (2015). Prebióticos, concepto, propiedades y efectos beneficiosos. *Nutrición Hospitalaria – Coden Nuhoeq*, 31(1), p. 99–118.

Helen, M., Mukerjea, R., Robyt, J. (2011). Comparative study of the efficacies of nine assay methods for the dextransucrase synthesis of dextran. *ScienceDirect – Elsevier*, (346), p. 1077–1082.

Manzoni, M., Bergomi, S., Rollini, M., Cavazzoni, V. (1999). Production of statins by filamentous fungi. *Biotechnology Letters*. (21), p. 253-257.

Monsan, P., Bozonnet, S., Albenne, C., Joucla, G., Willemot, R. M., Remaud-Siméon, M. (2001). Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 11(9), p. 675-685. Recuperado el 12 de Marzo de 2014 de la base de datos electrónica de la Universidad de la Salle (ScienceDirect).

Mukamolava, G., Kaprelyants, A., Kell, D., Young, M. (2003). Adoption of the transiently non-culturable state – a bacterial survival strategy. *Elsevier – Science Ltd*. (47), p. 65-29.

Quirasco, M., Munguía, A., Simeon, M., Monsan, P., Farrés, A. (1999). Induction and transcription studies of the dextransucrase gene in *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(12), p. 5504-5509.

Remaud, M., Willemot, R., Sarcabal, P., Potocki, G., Monsan, P. (1999). Glucanases: molecular engineering and oligosaccharide synthesis. *Elsevier – Journal of molecular catalysis B: Enzymatic*, (10), p. 117 – 128.

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

Rodrigues, S., Lona, L., Franco, T.(2003). Effect of phosphate concentration on the production of dextransucrase by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F.*Bioprocess BiosystEng*, 26(1), p. 57–62.

Santos, M., Teixeira. J., Rodrigues. A. (1999). Production of dextransucrase, dextran and fructose from sucrose using *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512(f). *BiochemicalEngineeringJournal*, (4), p. 177 – 188. Recuperado el 11 de Agosto de 2014 de la base de datos electrónica de la Universidad de la Salle (ScienceDirect).

Sarbini, S., Kolida, S., Naeye, T., Einerhand, A, Gibson, G., Rastall, R. (2013). The prebiotic effect of α -1,2 branched, low molecular weight dextran in the batch and continuous faecal fermentation system. *Journal of functionalfoods*, (5), p. 1938 – 1946. Recuperado el 6 de Octubre de 2014 de la base de datos electronica de la Universidad de la Salle (ScienceDirect).

Tsuchiya, H., Koepsell, H., Corman, J., Bryant, G., Bogard, O., Feger, V., Jackson, W. (1952). The effect of certain cultural factors on production of dextransucrase by *Leuconostoc mesenteroides*.*Northern Regional Research Laboratory*, 64, p. 521-526.

Tesis

Alcalde, M. (1999). *Modificación química y estabilización de glicosiltransferasas: ciclodextringlicosiltransferasa y dextransacarasa*. Tesis de pregrado. Universidad complutense de Madrid, Madrid, España.

Avendaño, C. (2010). *Evaluación de los efectos fisiológicos y bioquímicos de una dextrana en roedores de laboratorio*. Tesis para Magister. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

Florez, G., Y. (2014). *Estudio de la enzima dextransacarasa (DS) producida por Leuconostoc mesenteroides cepa IBUN 91.2.98*. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

Rodriguez, M. (2003). *Desarrollo y validación de modelos matemáticos para la predicción de vida comercial de productos cárnicos*. Tesis de Doctorado. Universidad de Cordoba, Cordoba, Colombia.

Soler, A. (2009). *Evaluación de un sistema de aireación externo en la fermentación con Leuconostoc lactis*. Tesis de pregrado. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

Vanegas, O. L., (2006). *Evaluación de los componentes del medio de cultivo y su influencia sobre la producción de la enzima glucansacarasa obtenida por fermentación de la cepa IBUN 34.1*. Proyecto de grado. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

Cibergrafía

Cabeza E. (2006). Bacterias ácido-lácticas (BAL): aplicaciones como cultivos estárter para la industria láctea y cárnica. *Simposio regional de microbiología*. Consultado el 05 de septiembre, 2013. En: [http://www.academia.edu/992789/Bacterias_%C3%A1cido-l%C3%A1cticas BAL aplicaciones como cultivos est%C3%A1rter para la industria l%C3%A1ctea y c%C3%A1rnica](http://www.academia.edu/992789/Bacterias_%C3%A1cido-l%C3%A1cticas_BAL_aplicaciones_como_cultivos_est%C3%A1rter_para_la_industria_l%C3%A1ctea_y_c%C3%A1rnica)

Carrera, J. (2003, febrero 28) producción y aplicación de enzimas industriales. Consultado el 19 de Agosto, 2014. En: <http://www.unicauca.edu.co/biotecnologia/ediciones/vol1/Ar11.pdf>

Chegwin, C., Nieto, I., Atehortúa, L., Sepúlveda, L. (2012, abril 24). Las estaninas: Actividad biológica y producción biotecnológica. [En línea], Español. Disponible: <http://www.bdigital.unal.edu.co/36566/6/37418-170090-2-PB.html> [2015, agosto 4].

Organización Mundial de Gastroenterología. (2008, mayo) Guías prácticas de la OMGE. World Gastroenterology Organisation. [En línea], Español. Disponible: http://www.worldgastroenterology.org/assets/downloads/es/pdf/guidelines/19_probioticos_prebioticos_es.pdf [2014, marzo 8].

ANEXO 1

PROTOCOLO MÉTODO DE TINCIÓN DE GRAM

(Elaborado por Ing. Andrea Soler Galindo – Adaptado para el presente trabajo por las autoras)

Principio:

La composición y estructura química de la pared celular varía dependiendo si la bacteria es gramnegativa o grampositiva, antes de aplicar el alcohol acetona (decolorante) todas las bacterias se observan de color violeta, al aplicar decolorante algunas bacterias conservan el color (**grampositivas**), mientras que otras se decoloran (**gramnegativas**). Esto se debe a que el alcohol acetona desorganiza la membrana externa de las bacterias gramnegativas (constituida principalmente por lipoproteínas y lipopolisacáridos) y permite la salida del colorante primario, de modo que los microorganismos quedan desprovistos de color y al agregar la fucsina éstos se tiñen de rojo (Negroni, 2009).

Equipos:

- Microscopio óptico

Materiales

- Mechero
- Asas microbiológicas
- Láminas porta objetos
- Cronómetro

Reactivos

- Solución violeta de Gram.
- Solución de Lugol.
- Solución Alcohol – Acetona, 50-50 %v/v
- Solución Safranina o fucsina de Gram.
- Solución Salina NaCL (0.8 % p/v)

Procedimiento:

Preparación de muestra:

En una lámina porta-objeto, limpia y desengrasada adicione, con ayuda del asa microbiológica redonda, una gota pequeña de solución salina al 0.8%. Esterilice la punta del asa en el mechero y tome una asada de la muestra en condiciones asépticas (si así se requiere) y únala con la gota de solución salina del porta-objeto; homogenice suavemente, y deje secar al ambiente; se puede secar flameando al mechero rápidamente para evitar lizar las células.

Luego que la muestra se encuentre completamente seca, adicione los reactivos mostrados en la siguiente tabla respetando el orden y los tiempos establecidos:

Orden de los reactivos para tinción de gram

Orden	Reactivo	Tiempo (seg.)
1	Solución violeta de Gram	60
2	Lavar con agua	
3	Solución lugol	60
4	Lavar con agua	
5	Solución alcohol – acetona	15
6	Lavar con agua	
7	Solución safranina	60
8	Lavar con agua y secar al ambiente	

ANEXO 2

PROTOCOLO CURVA DE CALIBRACIÓN DE *Leuconostoc mesenteroides*

(Elaborado por Dr. Dionisio Malagón – Adaptado para el presente trabajo por las autoras)

Equipos

- Bomba de vacío
- Estufa
- Espectrofotómetro

Materiales

- Membranas de 47mm de diámetro y tamaño de poro de 4,5 μ m
- Celdas de 1cm de paso de luz
- Balón aforado de 100mL
- Probeta de 50mL
- Cajas de Petri pequeñas

Reactivos

- Solución salina al 0,9% estéril
- Solución madre

Procedimiento:

- Dejar las membranas de 47mm de diámetro y tamaño de poro de 4,5 μ m a 60°C hasta alcanzar peso constante y registrar el peso.
- Obtener la solución madre como se describe en el apartado 2.3., a éste extracto enzimático se le realizan 3 lavados con solución salina al 0,9% y centrifugando a 7500rpm por 5min cada una.
- La solución madre obtenida en el punto anterior se afora en un balón de 100mL, en una probeta sacar de esta solución 50mL, medir densidad óptica a 600nm realizando una dilución 1:10 con solución salina estéril al 0,9%, registrar y filtrar en membranas previamente pesadas empleando la unidad de filtración al vacío.
- A los 50mL restantes de la solución madre, aforar a 100mL con solución salina al 0,9%, está será la solución A, mezclar bien, en una probeta sacar 50mL de la solución A, medir densidad óptica a realizando una dilución 1:10 con solución salina estéril al 0,9%, registrar y filtrar en membranas previamente pesadas empleando la unidad de filtración al vacío.
- A los 50mL restantes de la solución A, aforar a 100mL con solución salina al 0,9%, está será la solución B, mezclar bien, en una probeta sacar 50mL de la solución B, medir densidad óptica a 600nm realizando una dilución 1:10 con solución salina estéril al 0,9%,

registrar y filtrar en membranas previamente pesadas empleando la unidad de filtración al vacío.

- A los 50mL restantes de la solución B, aforar a 100mL con solución salina al 0,9%, está será la solución C, mezclar bien, en una probeta sacar 50mL de la solución C, medir densidad óptica a 600nm realizando una dilución 1:10 con solución salina estéril al 0,9% , registrar y filtrar en membranas previamente pesadas empleando la unidad de filtración al vacío.
- A los 50mL restantes de la solución C, aforar a 100mL con solución salina al 0,9%, está será la solución D, mezclar bien, en una probeta sacar 50mL de la solución D, medir densidad óptica a 600nm realizando una dilución 1:10 con solución salina estéril al 0,9% , registrar y filtrar en membranas previamente pesadas empleando la unidad de filtración al vacío.
- A los 50mL restantes de la solución D, aforar a 100mL con solución salina al 0,9%, está será la solución E, mezclar bien, en una probeta sacar 50mL de la solución E, medir densidad óptica a 600nm realizando una dilución 1:10 con solución salina estéril al 0,9% , registrar y filtrar en membranas previamente pesadas empleando la unidad de filtración al vacío.
- A los 50mL restantes de la solución E, aforar a 100mL con solución salina al 0,9%, está será la solución F, mezclar bien, en una probeta sacar 50mL de la solución F, medir densidad óptica a 600nm realizando una dilución 1:10 con solución salina estéril al 0,9%, registrar y filtrar en membranas previamente pesadas empleando la unidad de filtración al vacío.
- Colocar las membranas en cajas de Petri a 60°C hasta peso constante, registrar peso.
- La diferencia de peso de las membranas es el peso de la biomasa seca contenida en 50mL de suspensión, por lo tanto la concentración celular se encuentra al dividir dicha diferencia entre 50mL (tener en cuenta las unidades).
- Realizar una gráfica que correlacione la absorbancia y la concentración celular, se debe obtener una tendencia lineal con un R^2 preferiblemente de 0,99.

En la siguiente tabla se presentan los resultados obtenidos para realizar la curva de calibración de peso seco.

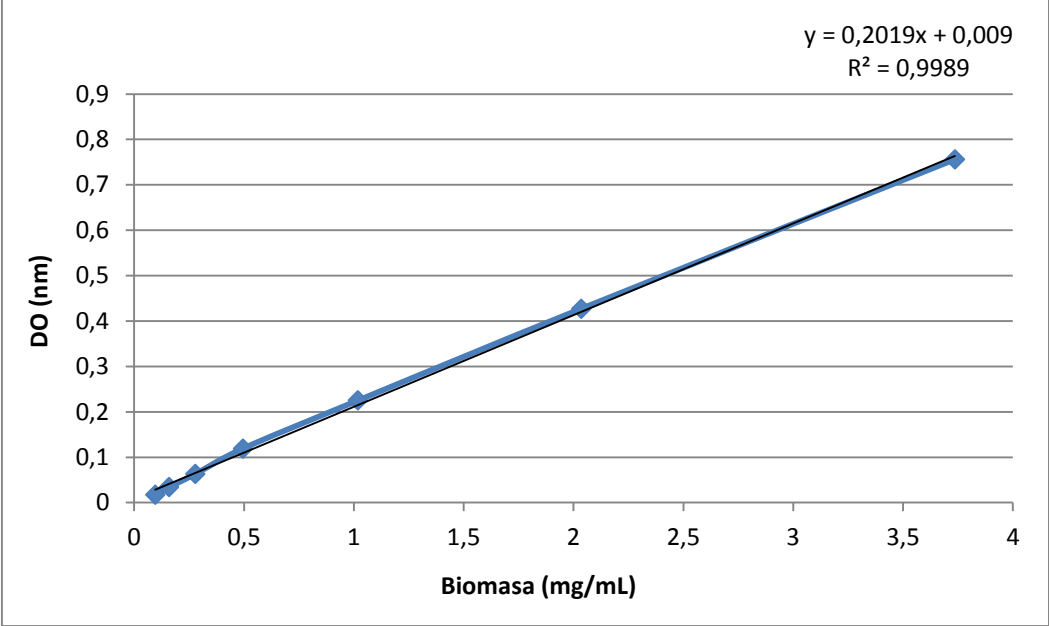
CURVA DE CALIBRACIÓN

Resultados obtenidos para peso seco

Dilución	Densidad óptica (600nm)	Peso Seco (mg/mL)
1	0,756	3,736
2	0,427	2,034
3	0,225	1,018
4	0,119	0,494
5	0,063	0,278
6	0,034	0,158
7	0,017	0,096

Una vez registrados los datos de peso seco para cada suspensión se graficó la respectiva curva de peso seco con respecto a la densidad óptica. Esta curva fue utilizada para cuantificar la biomasa en los diferentes medios de cultivo.

Curva de calibración densidad óptica y biomasa para *Leuconostoc mesenteroides* (IBUN 34,1)



ANEXO 3

CÁLCULOS PARA DETERMINAR LA CANTIDAD DE NITRÓGENO QUE APORTA EL DIHIDROGENO FOSFATO DE AMONIO Y LA HARINA DE SOYA

Cantidad de nitrógeno aportado por el dihidrógeno fosfato de amonio:

$$\begin{aligned}(\text{NH}_4)(\text{HPO}_4) &= 132,97\text{g} \\ \text{PM}(\text{N}) &= 28\text{g} \\ 1\text{mol } (\text{NH}_4)(\text{HPO}_4) &= 132,97\text{g} \\ 1\text{mol N} &= 28\text{g} \\ \frac{28\text{g}}{132,97} &= 0,1053\text{g}\end{aligned}$$

1g de $(\text{NH}_4\text{HPO}_4)$ aporta 0,1053 g de Nitrógeno

Cantidad de nitrógeno aportado por la harina de soya:

$$\begin{aligned}\% \text{proteína} &= \% \text{nitrógeno} * k \\ k &= \text{factor del alimento (5,71)} \\ \% \text{Nitrógeno} &= \frac{\% \text{proteína}}{k} \\ \% \text{Nitrógeno} &= \frac{90}{5,71} = 15,76\end{aligned}$$

1g de harina de soya aportaría 0,1576 g de Nitrógeno

Las formulaciones de los medios de cultivo de la tabla 4 quedaron de la siguiente manera:

- Para la formulación de 25% sustitución de extracto de levadura por harina de soya: 0,32g de harina de soya, 1,5g de extracto de levadura y 0% de dihidrógeno fosfato de amonio.
- Para la formulación de 50% sustitución de extracto de levadura por harina de soya: 0,63g de harina de soya, 1,0g de extracto de levadura y 0% de dihidrógeno fosfato de amonio.
- Para la formulación de 60% sustitución de extracto de levadura por harina de soya: 0,76g de harina de soya, 0,8g de extracto de levadura y 0% de dihidrógeno fosfato de amonio.
- Para la formulación de 75% sustitución de extracto de levadura por harina de soya: 0,95g de harina de soya, 0,5g de extracto de levadura y 0% de dihidrógeno fosfato de amonio.
- Para la formulación de 25% sustitución de extracto de levadura por dihidrógeno fosfato de amonio: 0,24g de dihidrógeno, 1,5g de extracto de levadura y 0% de harina de soya.
- Para la formulación de 25% sustitución de extracto de levadura por dihidrógeno fosfato de amonio: 0,47g de dihidrógeno, 1,0g de extracto de levadura y 0% de harina de soya.
- Para la formulación de 25% sustitución de extracto de levadura por dihidrógeno fosfato de amonio: 0,57g de dihidrógeno, 0,8g de extracto de levadura y 0% de harina de soya.
- Para la formulación de 25% sustitución de extracto de levadura por dihidrógeno fosfato de amonio: 0,71g de dihidrógeno, 0,5g de extracto de levadura y 0% de harina de soya.

ANEXO 4

PROTOCOLO DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA: TRANSFERENCIA E HIDROLÍTICA

(Elaborado por Ing. Andrea Soler Galindo – Adaptado para el presente trabajo por las autoras)

Determinación de la actividad enzimática expresada en micromoles (μmol) de glucosa transferida por minuto, utilizando como sustrato sacarosa.

Una unidad de actividad (U) es definida como: *“La cantidad de enzima necesaria para transferir un micromol (μmol) de glucosa por minuto a una temperatura de 30°C, pH 5 y una concentración de sustrato de 80g/L.”*

Equipos:

- Baño termostato
- Centrifuga
- Espectrofotómetro
- Plancha de calentamiento

Materiales:

- Celda reactiva
- Celdas de 1cm de paso de luz
- Agitador magnético
- Vaso de precipitado de 500mL
- Tubos de ensayo
- Microtubos (Epenndorf)
- Pipetas automáticas
- Pipetas de 5 y 10 mL

Reactivos

- Sustrato: Preparar 100mL de una solución tampón fosfato 50 mM a pH 5,5, con una concentración de sacarosa de 160 mg/mL (ver anexo 7)
- Reactivo DNS: (ver anexo 8)
- Reactivo glucosa GOD-PAD: (ver anexo 5)
- Extracto enzimático: producto obtenido de la separación celular con el medio de cultivo (enzima extracelular)

Procedimiento

Colocar 10 mL de sustrato en el reactor de vidrio, a una temperatura de 30°C con agitación magnética; atemperar por 5 minutos.

Transcurrido este tiempo, adicionar 10 mL de enzima al reactor; Cronometrar tomando el tiempo cero, como el momento de adición de la enzima.

Inactivación de las muestras:

- Con la ayuda de una micropipeta tomar una alícuota de 500 μL aproximadamente de la reacción en un tubo de ensayo, inactivar inmediatamente al calor sumergiéndolo en agua a ebullición por 5 minutos
- Los tiempos de toma de alícuotas son: 0, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70 y 80 minutos.
- Transcurridos los 5 minutos enfriar los tubos en agua con hielo, posteriormente almacenar cada muestra en el microtubo correspondiente previamente marcado, tapar bien y refrigerar.
- Paralelamente, a medida que marcha la reacción enzimática, hay un aumento de viscosidad muy marcado, lo que dificulta la toma de muestra, para ello se puede hacer un pequeño corte a la punta a utilizar en la micropipeta, de tal manera que el orificio sea mayor, y permita una mayor succión.

Homogenización de la muestra

- Agite las muestras mediante vórtex

Diluciones

- Preparar 10 tubos de ensayo cada uno con 525 μL de agua destilada en una gradilla debidamente marcados (0, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70 y 80), aparte preparar un tubo con 500 μL de agua destilada marcado como blanco.
- Preparar 10 celdas de 1cm de paso de luz cada una con 50 μL de agua destilada en una gradilla para celdas debidamente marcadas (0, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70 y 80), aparte preparar dos celdas una con 100 μL de agua destilada marcada como blanco y la otra marcada como estándar.
- Adicionar 25 μL del contenido del microtubo (reacción enzimática inactivada) al tubo de ensayo correspondiente, procurando no desalojar la muestra en las paredes, sino depositarla en el fondo (dilución 1:22). Con ayuda de un vórtex agitar por 0.5 minutos.
- Tomar 50 μL de cada tubo de ensayo y pasarlos a las respectivas celdas, procurando depositar la muestra en el fondo de la celda (dilución 1:44).

Análisis:

Realizar el procedimiento indicado en el anexo 9 para azúcares reductores y en el anexo 5 para Glucosa. Según indica la etiqueta el Kit de Glucosa su error relativo no supera el 0.1% y como se observa en la figura del anexo 9, la dispersión de datos en los duplicados para la determinación de azúcares no supera una diferencia de 0.0134 en la absorbancia.

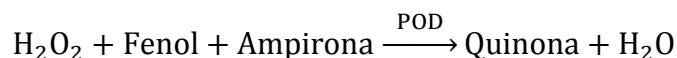
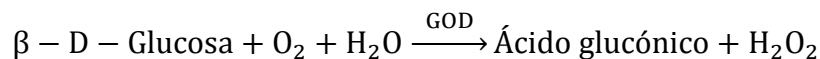
ANEXO 5

PROTOCOLO MÉTODO COLORIMÉTRICO PARA LA DETERMINACIÓN DE GLUCOSA

KIT DE GLUCOSA

Principio:

La glucosa oxidasa (GOD) cataliza la oxidación de glucosa de ácido glucónico. El peróxido de hidrógeno (H₂O₂), producido se detecta mediante un aceptor cromogénico de oxígeno, fenol-ampirona en presencia de peroxidasa (POD):



La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de glucosa presente en la muestra ensayada.

Equipos:

- Espectrofotómetro
- Pipetas automáticas

Materiales

- Celdas de 1cm de paso de luz

Reactivos

R1 Tampón	TRIS pH 7,4	92 mmol/L
R2 Enzimas	Glucosa oxidasa (GOD) Peroxidasa (POD) 4-Aminofenazona (4-AF)	15000 U/L 1000 U/L 2,6 mmol/L
GLUCOSA CAL	Patrón primario acuoso de Glucosa	100mg/dL

Preparación solución estándar

Del patrón primario acuoso de glucosa (100mg/dL) realizar una dilución 1:10 con agua destilada desionizada, para obtener una concentración de 0.1mg/ml.

Preparación solución reactiva

Reactivo de trabajo (RT): Disolver el contenido de un vial de R2 Enzimas en un frasco R1 Tampón. Tapar y mezclar suavemente hasta disolver su contenido.

Estabilidad: 1 mes en nevera (2–8 °C) o 7 días a temperatura ambiente (15–25 °C)

Procedimiento:

- Condiciones del ensayo
 - Longitud de onda..... 510 nm
 - Celda..... 1 cm paso de luz
 - Temperatura..... 37 °C / 15 – 25 °C
- Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada
- Pipetear en una cubeta

	Blanco	Patrón	Muestra
RT (mL)	1.0	1.0	1.0
Patrón (µL)	-	10	-
Muestras (µL)	-	-	10
Agua destilada (µL)	10	-	-

- Mezclar e incubar 10 minutos a 37°C o 20 minutos a temperatura ambiente (15 – 25 °C)
- Leer la absorbancia (A) del patrón y la muestra, frente al blanco de reactivo. El color es estable como mínimo 30 minutos

Cálculos

$$\frac{(A)Muestra}{(A)Patrón} \times 100 (\text{Conc. Patrón}) = \frac{\text{mg}}{\text{dL}} \text{ de glucosa en la muestra}$$

$$\text{Factor de conversión: } \frac{\text{mg}}{\text{dL}} \times 0.0555 = \text{mmol/L}$$

ANEXO 6

PROTOCOLO MUESTRA DE CÁLCULO EN LA DETERMINACIÓN EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

(Elaborado por Ing. Andrea Soler Galindo – Adaptado para el presente trabajo por las autoras)

Actividad hidrolítica

Se calcula punto a punto dentro del ensayo de actividad enzimática anexo 4 – la diferencia entre la concentración de azúcares reductores determinada por el método colorimétrico DNS, - anexo 9 – y la concentración de glucosa determinada por el método enzimático Kit GOD – POD – anexo 5 – expresándolos en mg/ml teniendo en cuenta la dilución que según el protocolo es de 1:22 en el DNS y de 1:44 en el KIT, lo que cuantifica la fructosa obtenida en la hidrólisis. Se determina la actividad hidrolítica como la pendiente de la curva de la diferencia mencionada versus tiempo en el inicio de la reacción enzimática.

Actividad de transferencia

Inicialmente se determinó la diferencia de la fructosa proveniente de la hidrólisis y la glucosa libre obtenida por el método enzimático (Kit GOD-POD) para determinar la glucosa transferida. La fructosa de hidrólisis (Fh) es equivalente a la glucosa total (Gl + Gt). Finalmente se determinó la actividad de transferencia como la pendiente entre la diferencia mencionada y el tiempo de la velocidad inicial de reacción enzimática (0 – 50 minutos).

Dónde: $DNS = Fh + Gl$

$KIT = Gl$

Fh = fructosa proveniente de la reacción de hidrólisis

Gt = glucosa transferida

Gl = glucosa libre

En la siguiente tabla se muestra los resultados obtenidos para la determinación de la actividad enzimática.

Determinación de la actividad enzimática

Tiempo (min)	DNS ^a (mg/ml)	KIT ^b (mg/ml)	DNS – KIT (mg/ml)	DNS – 2KIT (mg/ml)
0	0	0	0	0,00
10	11,77	0,78	10,99	10,21
15	21,02	2,25	18,78	16,53
20	25,23	3,22	22	18,78
30	34,76	3,61	31,14	27,53
40	43,45	5,18	38,270	33,09
50	54,94	9,47	45,46	35,99
60	61,39	9,96	51,42	41,46
70	74,28	11,43	62,85	51,42

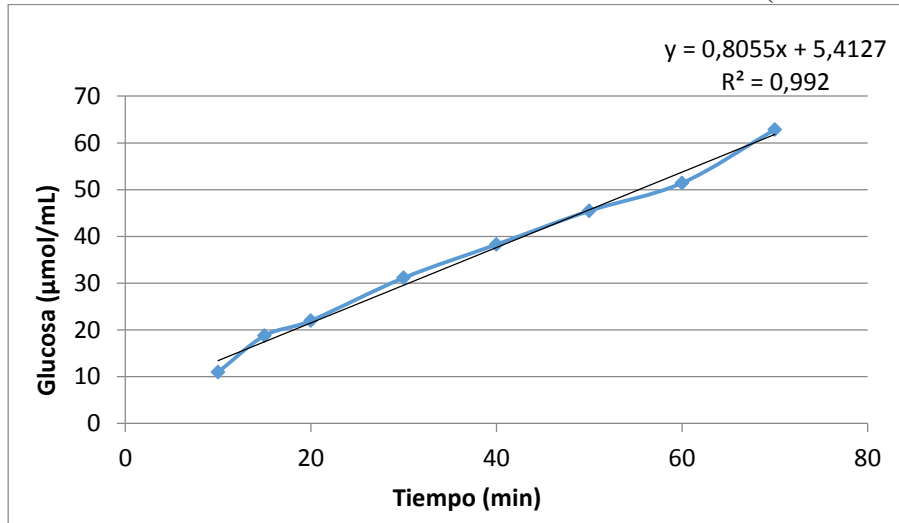
a: obtener las concentraciones según curva de calibración y dilución – anexo 4

b: obtener las concentraciones según curva de calibración y dilución – anexo 5

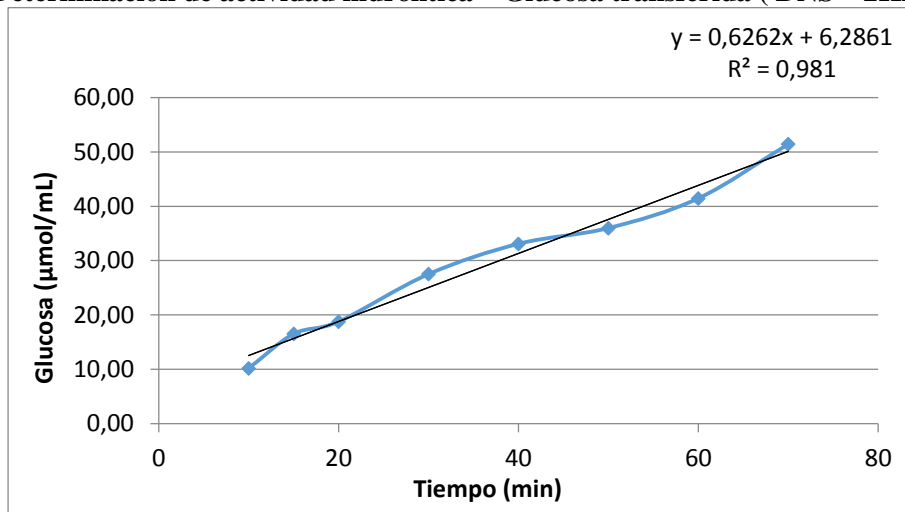
Obtener los gráficos de DNS – 2KIT (Glucosa transferida) y DNS – KIT (fructosa libre) en mg/ml contra tiempo. Linealizar y hallarla la pendiente.

En la figura 15 se evidencia el gráfico que representa la determinación de actividad de transferencia – fructosa libre (DNS – KIT), en la figura 16 se evidencia el gráfico que representa la determinación de actividad hidrolítica – glucosa transferida (DNS – 2KIT)

Determinación de actividad de transferencia – Fructosa libre (DNS – KIT)



Determinación de actividad hidrolítica – Glucosa transferida (DNS – 2KIT)



Pendiente de DNS-KIT: 0,8055 ($\mu\text{mol/mL}$)

Pendiente de DNS-2KIT: 0,6262 ($\mu\text{mol/mL}$)

Actividad de la enzima

Actividad de transferencia: 6,77 U/mL

Actividad hidrolítica: 8,10 U/mL

ANEXO 7

PROCOLO TAMPÓN FOSFATO PH 5,5 – 16% SACAROSA

(Elaborado por Ing. Jhon Glaeather Florez – Adaptado para el presente trabajo por las autoras)

Equipos

- pH metro
- balanza analítica
- Plancha de agitación
- Balón aforado

Materiales

- Sacarosa
- Agua destilada

Reactivos

- Ácido ortofosfórico (H_3PO_4)
- Hidróxido de sodio (NaOH)

Procedimiento:

Se coloca en agitación 80ml de agua destilada y se le adicionan 0,287 ml de ácido ortofosfórico y se ajusta pH A 5,5 con hidróxido de sodio. Una vez se tiene el pH indicado se adicionan 16g de sacarosa y se afora a 100ml.

ANEXO 8

PROTOCOLO PREPARACIÓN DE REACTIVO DNS

Equipos

- Plancha de calentamiento
- Balanza analítica

Materiales

- Agitadores magnéticos
- Frasco ámbar por 100ml
- Espátula
- Vidrio de reloj
- Probeta de 100 mL
- Balón aforado de 250 mL

Reactivos

- Reactivo DNS (ácido 3 – 5 dinitrosalicílico)
- Tartrato de Na – K
- Hidróxido de sodio

Preparación:

Utilizando la plancha de calentamiento con agitación disolver 4g de hidróxido de sodio en 180 mL de agua. Pesar 75g de Tartrato de Na – K, y disolverlos en la solución de NaOH caliente. Pesar 2.5g de DNS y disolverlo en la solución anterior. Permitir la disolución completa en caliente. Enfriar, aforar en frasco ámbar a 250 mL. Almacenar por 24 horas antes de su uso.

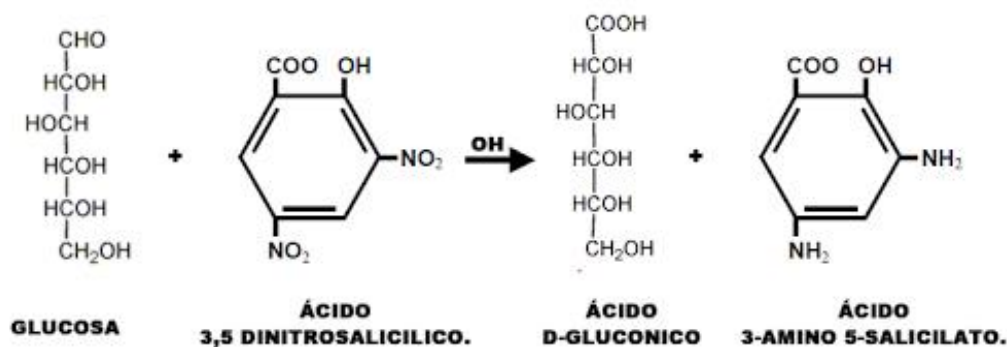
ANEXO 9

PROTOCOLO MÉTODO COLORIMÉTRICO PARA LA DETERMINACIÓN DE AZUCARES REDUCTORES ÁCIDO DINITROSALICILICO (DNS)

(Elaborado por Ing. Andrea Soler Galindo – Adaptado para el presente trabajo por las autoras)

Principio

Los azúcares reductores pueden ser medidos por medio del reactivo ácido 3,5 dinitrosalicílico, este se reduce en medio básico; la glucosa es oxidada a ácido glucónico, mediante la siguiente reacción:



Equipos

- Espectrofotómetro
- Plancha de calentamiento
- Pipetas automáticas
- Vórtex

Materiales

- 7 tubos de ensayo
- Gradilla
- Pipeta de 5 mL
- Cubos de hielo

Reactivos

- SOLUCIÓN DNS (Ver anexo 8)
- SOLUCIÓN STOCK DE GLUCOSA (Patrón)

Pesar 100 mg de glucosa grado analítico y disolver en 25 mL de agua destilada. (4mg/mL). Almacenar a -20°C.

Procedimiento

- Realizar las siguientes diluciones indicadas en la siguiente tabla:

Diluciones para el método colorimétrico DNS

Muestra	Patrón	Agua (µL)	Volumen final (µL)	Concentración (mg/mL)
Blanco	0	500	500	0
1	50	450	500	0.4
2	100	400	500	0.8
3	150	350	500	1.2
4	200	300	500	1.6
5	300	200	500	2.4
6	350	150	500	2.8

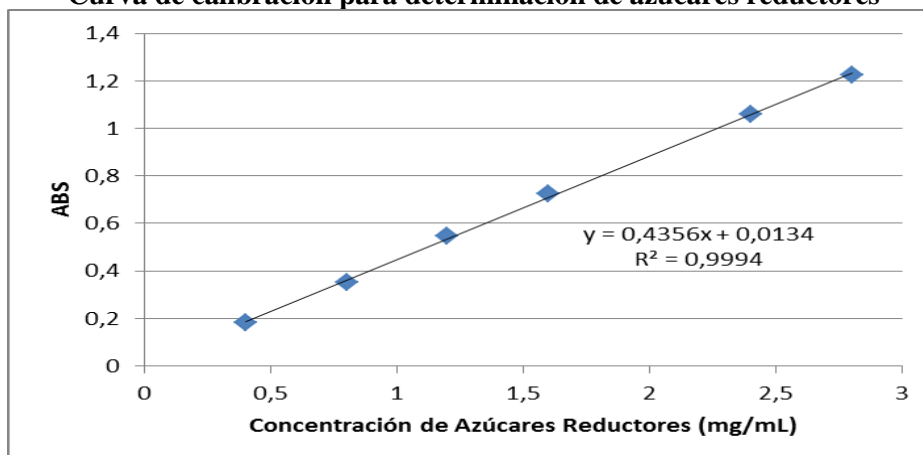
- A los µL de cada dilución incluyendo el blanco agregar 500 µL del reactivo DNS
- Agitar las muestras
- Colocar los tubos en ebullición por 5 minutos utilizando un vaso de precipitado
- Enfriar inmediatamente con hielo
- Adicionar a cada tubo 5 mL de agua destilada
- Agitar y dejar en reposo por 10 minutos
- Leer absorbancia a 540 nm
- Realizar la curva de calibración absorbancia vs concentración (mg/mL)

CURVA DE CALIBRACIÓN (como lo indica la tabla, en la siguiente figura se observa la curva de calibración para la determinación de azúcares reductores.

Curva de calibración para el método colorimétrico DNS

Muestra	Concentración (mg/mL)	Absorbancia (540 nm)
Blanco	0	-
1	0.4	0.181
2	0.8	0.354
3	1.2	0.545
4	1.6	0.725
5	2.4	1.059
6	2.8	1.224

Curva de calibración para determinación de azúcares reductores



ANEXO 10

ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LA SUSTITUCIÓN PARCIAL DE LA FUENTE DE NITRÓGENO POR DIHIDRÓGENO FOSFATO DE AMONIO Y HARINA DE SOYA

ANÁLISIS GENERAL PARA BIOMASA

Regresión factorial general: Biomasa vs. sustrato, %sust

Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales de la biomasa para todas las sustituciones no presentan diferencias significativas debido a la variación del factor evaluado.
Hipótesis alterna	Por lo menos una media es diferente de alguna de las sustituciones evaluadas presenta biomasa significativamente diferente a las demás debido a la variación del factor estudiado.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Sustrato	2	1, 2
%sust	5	1, 2, 3, 4, 5

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	9	18.039	2.0043	18.98	0.000
Lineal	5	14.457	2.8913	27.39	0.000
sustrato	1	3.453	3.4528	32.70	0.000
%sust	4	11.004	2.7510	26.06	0.000
Interacciones de 2 términos	4	3.582	0.8954	8.48	0.003
sustrato*%sust	4	3.582	0.8954	8.48	0.003
Error	10	1.056	0.1056		
Total	19	19.094			

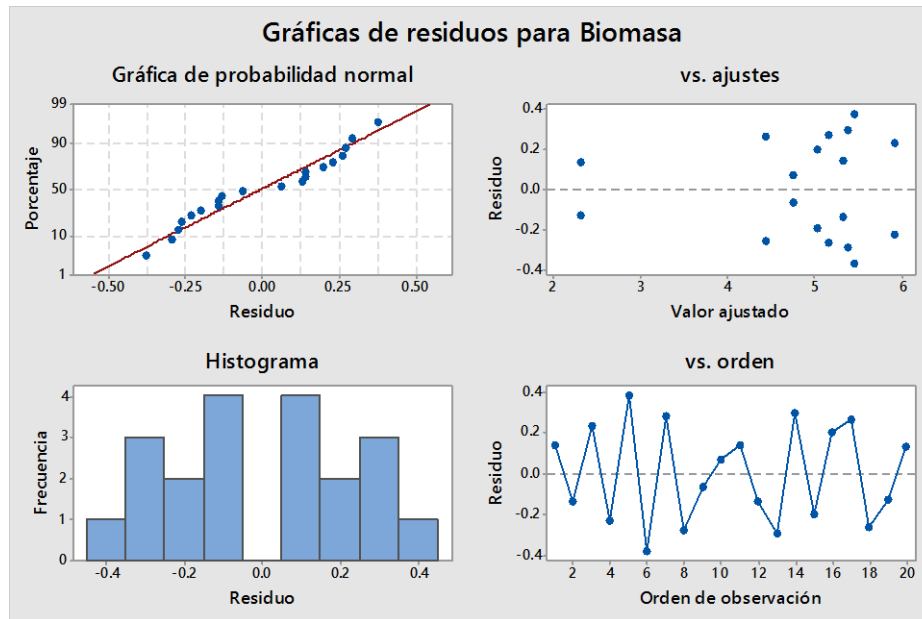
Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.324923	94.47%	89.49%	77.88%

Ecuación de regresión

$$\begin{aligned} \text{Biomasa} = & 4.9165 + 0.4155 \text{ sustrato}_1 - 0.4155 \text{ sustrato}_2 + 0.423 \text{ \%sust}_1 \\ & + 0.741 \text{ \%sust}_2 \\ & + 0.329 \text{ \%sust}_3 - 0.114 \text{ \%sust}_4 - 1.379 \text{ \%sust}_5 \\ & - 0.416 \text{ sustrato*%sust}_1 \end{aligned}$$

- 0.143 sustrato*%sust_1 2 - 0.201 sustrato*%sust_1 3
 - 0.053 sustrato*%sust_1 4
 + 0.812 sustrato*%sust_1 5 + 0.416 sustrato*%sust_2 1
 + 0.143 sustrato*%sust_2 2 + 0.201 sustrato*%sust_2 3 + 0.053 sustrato*%sust_2 4
 - 0.812 sustrato*%sust_2 5



a. Análisis de varianza ANOVA para los resultados obtenidos de sustitución parcial de fuente de nitrógeno por dihidrógeno fosfato de amonio para biomasa

Sustitución vs biomasa

ANOVA unidireccional: Biomasa vs. %sust

Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales de no hay variación significativa en la biomasa debido al nivel de sustitución de la fuente de nitrógeno por dihidrogeno fosfato de amonio.
Hipótesis alterna	Por lo menos una media es diferente de existe variación significativa en la biomasa debido a el nivel de sustitución de la fuente de nitrógeno por dihidrogeno fosfato de amonio.
Nivel de significancia	$\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
%sust	5	1, 2, 3, 4, 5

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
%sust	4	1.4469	0.3617	3.05	0.127
Error	5	0.5935	0.1187		
Total	9	2.0404			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.344529	70.91%	47.64%	0.00%

Medias

%sust	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
1	2	5.340	0.198	(4.714, 5.966)
2	2	5.930	0.325	(5.304, 6.556)
3	2	5.460	0.537	(4.834, 6.086)
4	2	5.165	0.389	(4.539, 5.791)
5	2	4.7650	0.0919	(4.1388, 5.3912)

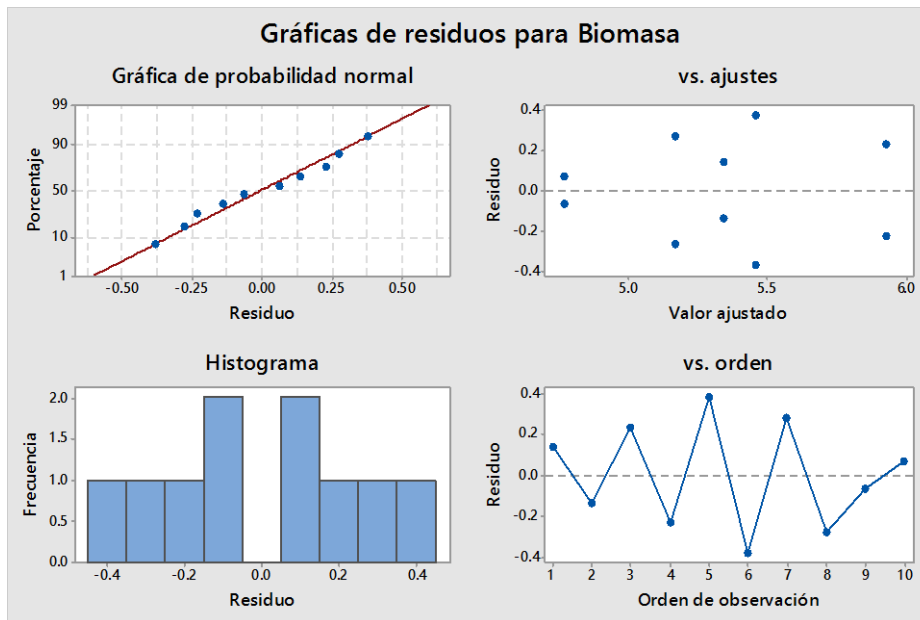
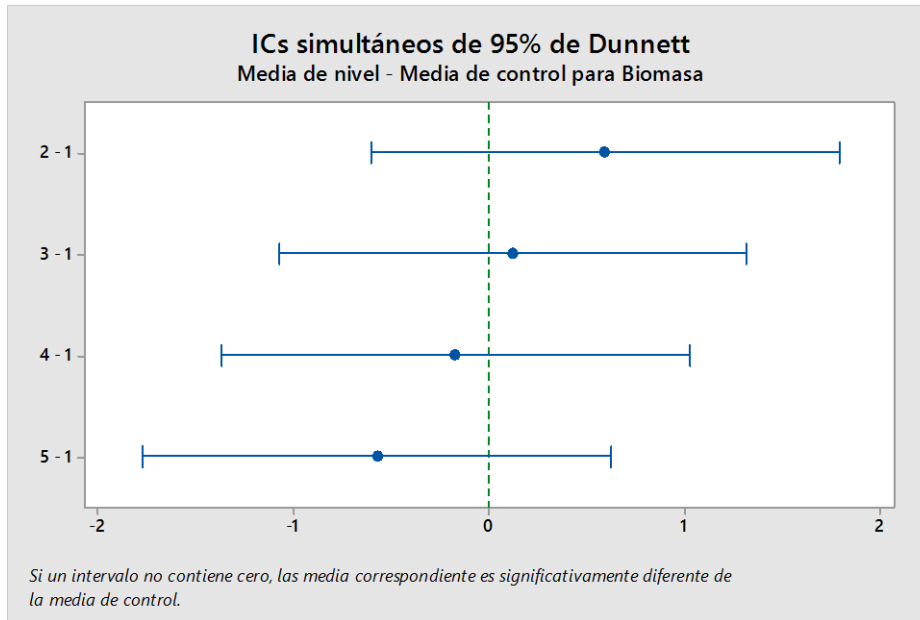
Desv.Est. agrupada = 0.344529

Comparación estadística ANOVA por medio de DUNNETT con un control para los resultados obtenidos de sustitución parcial de fuente de nitrógeno por dihidrógeno fosfato de amonio para biomasa

Agrupar información utilizando el método de Dunnett y una confianza de 95%

%sust	N	Media	Agrupación
1 (control)	2	5.340	A
2	2	5.930	A
3	2	5.460	A
4	2	5.165	A
5	2	4.7650	A

Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel de control.



b. Análisis de varianza ANOVA para los resultados obtenidos de sustitución parcial de fuente de nitrógeno por harina de soya para biomasa

Sustitución vs biomasa

ANOVA unidireccional: Biomasa vs. %sust

Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales de no hay variación significativa en la biomasa debido a el nivel de sustitución de la fuente de nitrógeno por harina de soya.
----------------	---

Hipótesis alterna	Por lo menos una media es diferente de existe variación significativa en la biomasa debido a el nivel de sustitución de la fuente de nitrógeno por harina de soya.
Nivel de significancia	$\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
%sust	5	1, 2, 3, 4, 5

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
%sust	4	13.1355	3.28471	35.53	0.001
Error	5	0.4623	0.09245		
Total	9	13.6011			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.304056	96.60%	93.88%	86.41%

Medias

%sust	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
1	2	5.340	0.198	(4.787, 5.893)
2	2	5.385	0.417	(4.832, 5.938)
3	2	5.030	0.283	(4.477, 5.583)
4	2	4.440	0.368	(3.887, 4.993)
5	2	2.310	0.184	(1.757, 2.863)

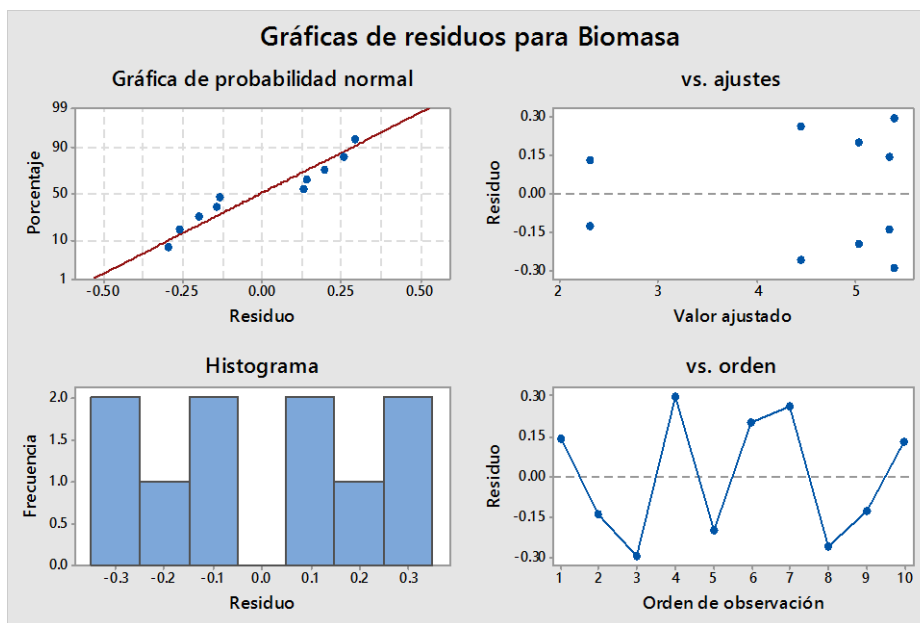
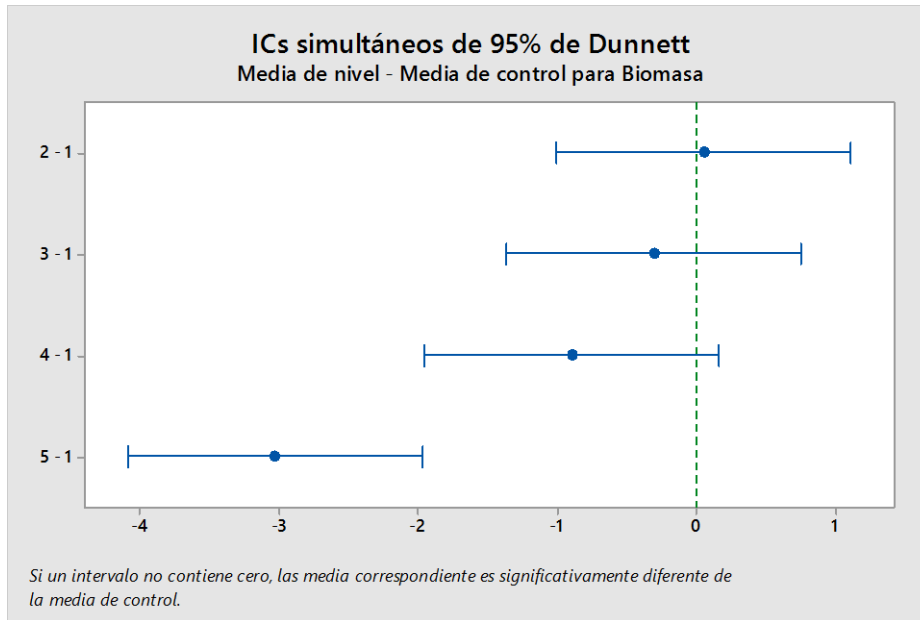
Desv.Est. agrupada = 0.304056

Comparación estadística ANOVA por medio de DUNNETT con un control para los resultados obtenidos de sustitución parcial de fuente de nitrógeno por harina de soya para biomasa

Agrupar información utilizando el método de Dunnett y una confianza de 95%

%sust	N	Media	Agrupación
1 (control)	2	5.340	A
2	2	5.385	A
3	2	5.030	A
4	2	4.440	A
5	2	2.310	

Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel de control.



ANÁLISIS GENERAL PARA ACTIVIDAD

Regresión factorial general: Actividad vs. sustrato, %sust

Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales de la variación en la fuente de nitrógeno no afecta significativamente la actividad enzimática.
Hipótesis alterna	Por lo menos una media es diferente de la variación en la fuente de nitrógeno afecta significativamente la actividad enzimática.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
sustrato	2	1, 2
%sust	5	1, 2, 3, 4, 5

Análisis de Varianza

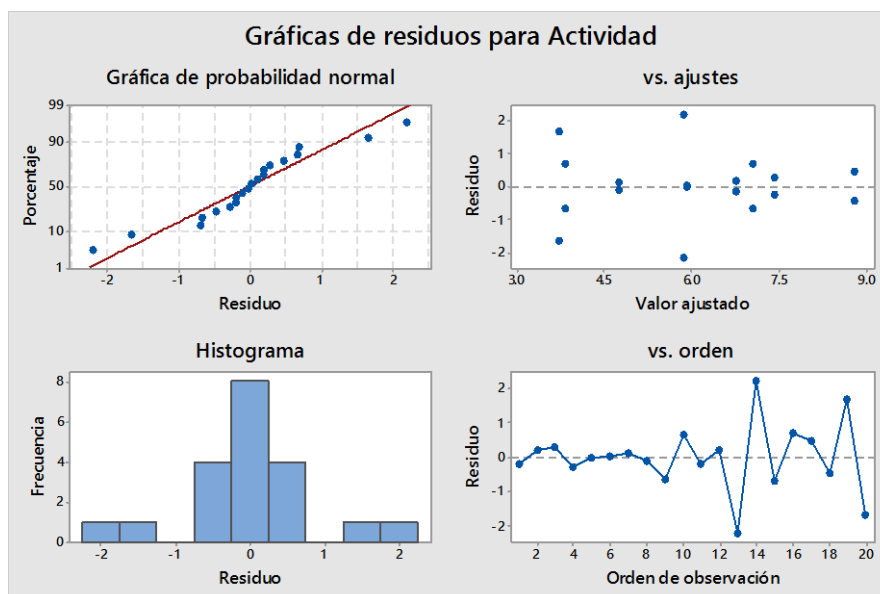
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	9	47.734	5.304	2.97	0.052
Lineal	5	29.901	5.980	3.35	0.049
sustrato	1	2.528	2.528	1.42	0.261
%sust	4	27.373	6.843	3.84	0.038
Interacciones de 2 términos	4	17.834	4.458	2.50	0.109
sustrato*%sust	4	17.834	4.458	2.50	0.109
Error	10	17.830	1.783		
Total	19	65.564			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
1.33527	72.81%	48.33%	0.00%

Ecuación de regresión

$$\begin{aligned}
 \text{Actividad} = & 6.093 - 0.355 \text{ sustrato}_1 + 0.355 \text{ sustrato}_2 + 0.682 \text{ \%sust}_1 \\
 & + 0.563 \text{ \%sust}_2 \\
 & + 0.395 \text{ \%sust}_3 + 0.690 \text{ \%sust}_4 - 2.330 \text{ \%sust}_5 \\
 & + 0.355 \text{ sustrato*%sust}_1 \text{ 1} \\
 & + 1.135 \text{ sustrato*%sust}_1 \text{ 2} - 0.217 \text{ sustrato*%sust}_1 \text{ 3} \\
 & - 1.682 \text{ sustrato*%sust}_1 \text{ 4} \\
 & + 0.408 \text{ sustrato*%sust}_1 \text{ 5} - 0.355 \text{ sustrato*%sust}_2 \text{ 1} \\
 & - 1.135 \text{ sustrato*%sust}_2 \text{ 2} \\
 & + 0.217 \text{ sustrato*%sust}_2 \text{ 3} + 1.682 \text{ sustrato*%sust}_2 \text{ 4} \\
 & - 0.408 \text{ sustrato*%sust}_2 \text{ 5}
 \end{aligned}$$



c. Análisis de varianza ANOVA para los resultados obtenidos de sustitución parcial de fuente de nitrógeno por dihidrógeno fosfato de amonio para actividad enzimática de transferencia.

Sustitución vs biomasa

ANOVA unidireccional: Biomasa vs. %sust

Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales de no hay variación significativa en la actividad debido a el nivel de sustitución de la fuente de nitrógeno por dihidrogeno fosfato de amonio.
Hipótesis alterna	Por lo menos una media es diferente de existe variación significativa en la actividad debido a el nivel de sustitución de la fuente de nitrógeno por dihidrogeno fosfato de amonio.
Nivel de significancia	$\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
%sust	5	1, 2, 3, 4, 5

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
%sust	4	17.341	4.3352	19.15	0.003
Error	5	1.132	0.2264		
Total	9	18.473			

Resumen del modelo

		R-cuad.	R-cuad.
S	R-cuad.	(ajustado)	(pred)
0.475784	93.87%	88.97%	75.49%

Medias

%sust	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
1	2	6.775	0.262	(5.910, 7.640)
2	2	7.435	0.389	(6.570, 8.300)
3	2	5.9150	0.0354	(5.0502, 6.7798)
4	2	4.745	0.163	(3.880, 5.610)
5	2	3.815	0.940	(2.950, 4.680)

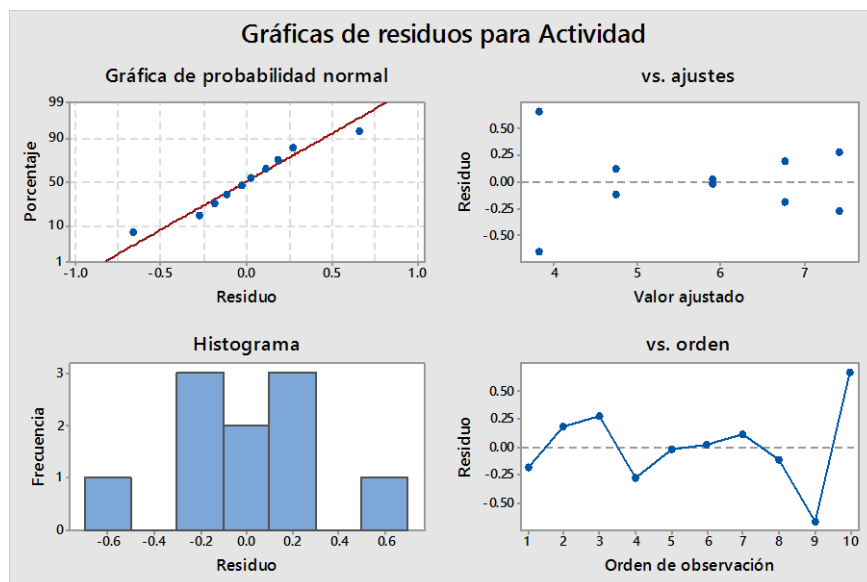
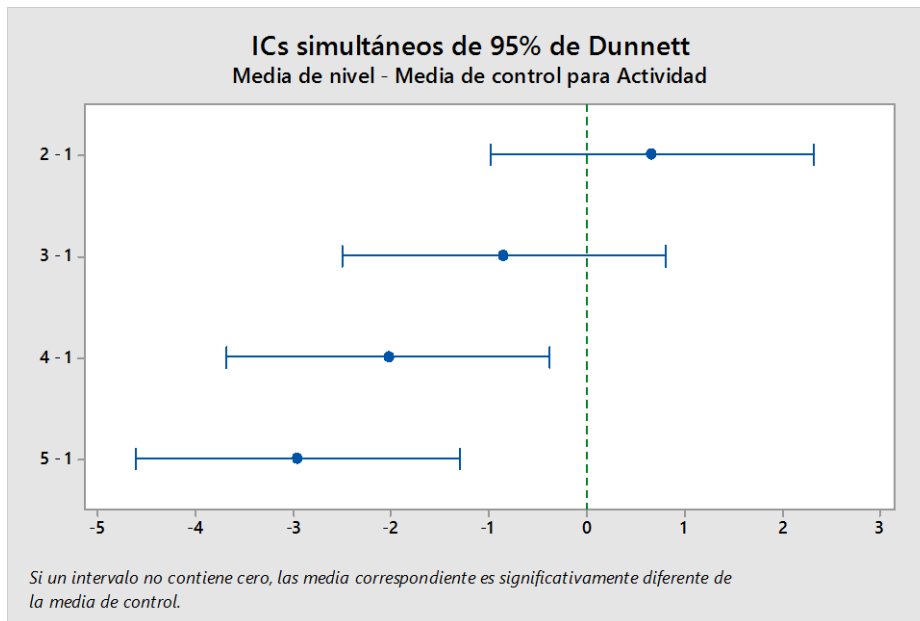
Desv.Est. agrupada = 0.475784

Comparación estadística ANOVA por medio de DUNNETT con un control para los resultados obtenidos de sustitución parcial de fuente de nitrógeno por dihidrógeno fosfato de amonio para actividad enzimática de transferencia.

Agrupar información utilizando el método de Dunnett y una confianza de 95%

%sust	N	Media	Agrupación
1 (control)	2	6.775	A
2	2	7.435	A
3	2	5.9150	A
4	2	4.745	
5	2	3.815	

Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel de control.



d. Análisis de varianza ANOVA para los resultados obtenidos de sustitución parcial de fuente de harina de soya para actividad enzimática de transferencia.

Sustitución vs biomasa

ANOVA unidireccional: Biomasa vs. %sust

Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales de no hay variación significativa en la actividad debido a el nivel de sustitución de la fuente de nitrógeno por harina de soya.
Hipótesis alterna	Por lo menos una media es diferente de existe variación significativa en la actividad debido a el nivel de sustitución de la fuente de nitrógeno por harina de soya.
Nivel de significancia	$\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
%sust	5	1, 2, 3, 4, 5

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
%sust	4	27.87	6.966	2.09	0.220
Error	5	16.70	3.340		
Total	9	44.56			

Resumen del modelo

	S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
	1.82744	62.53%	32.55%	0.00%

Medias

%sust	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
1	2	6.775	0.262	(3.453, 10.097)
2	2	5.88	3.12	(2.55, 9.20)
3	2	7.060	0.976	(3.738, 10.382)
4	2	8.820	0.665	(5.498, 12.142)
5	2	3.71	2.35	(0.39, 7.03)

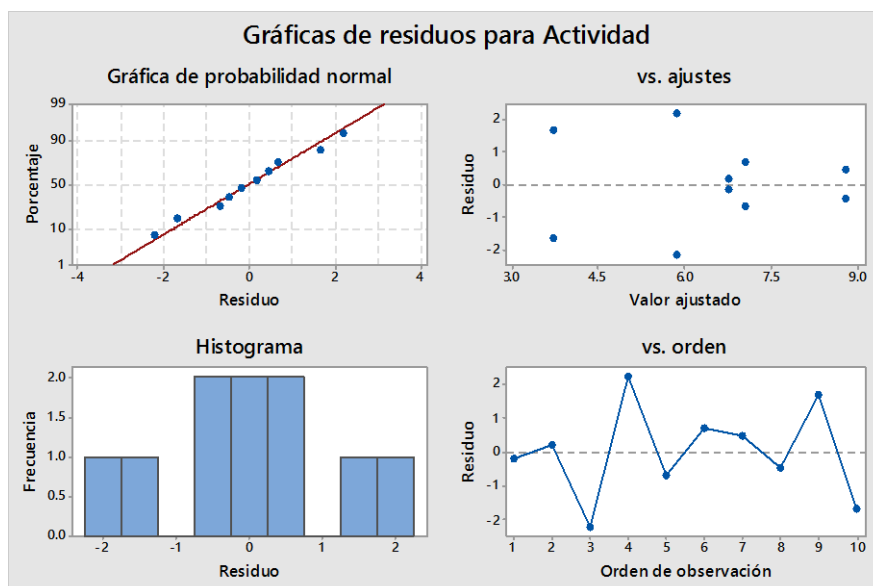
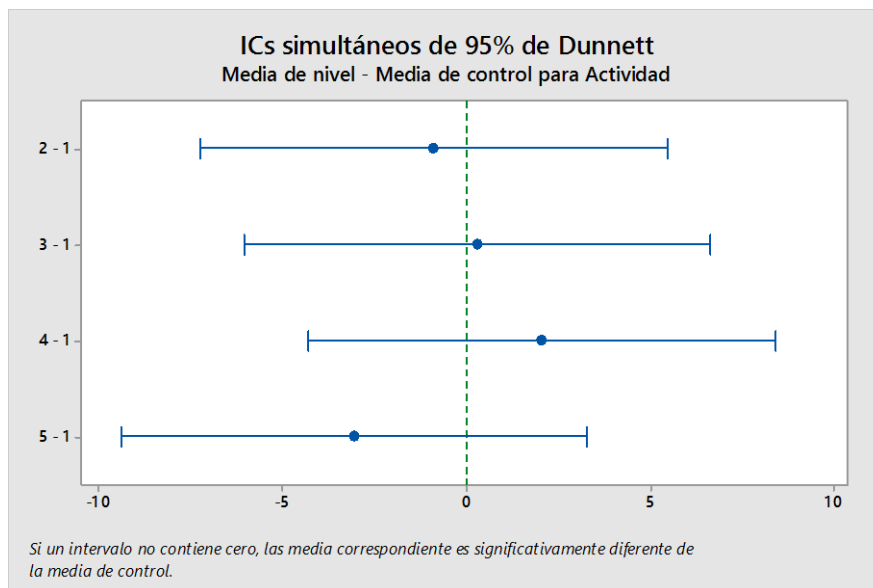
Desv.Est. agrupada = 1.82744

Comparación estadística ANOVA por medio de DUNNETT con un control para los resultados obtenidos de sustitución parcial de fuente de harina de soya para actividad enzimática de transferencia.

Agrupar información utilizando el método de Dunnett y una confianza de 95%

%sust	N	Media	Agrupación
1 (control)	2	6.775	A
4	2	8.820	A
3	2	7.060	A
2	2	5.88	A
5	2	3.71	A

Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel de control.



ANEXO 11

ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LA VARIACIÓN EN LA CONCENTRACIÓN DE LA FUENTE DE CARBONO PARA LAS FORMULACIONES DE 25% Y 50% DE SUSTITUCIÓN DE FUENTE DE NITRÓGENO POR DIHIDROGENO FOSFATO DE AMONIO

ANÁLISIS GENERAL PARA BIOMASA

Regresión factorial general: Biomasa vs. sustrato, %sust

Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales de la variación en la fuente de carbono no afecta significativamente el crecimiento del microorganismo.
Hipótesis alterna	Por lo menos una media es diferente de la variación en la fuente de carbono afecta significativamente el crecimiento del microorganismo.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
sustrato	2	1, 2
%sust	5	1, 2, 3, 4, 5

Análisis de Varianza

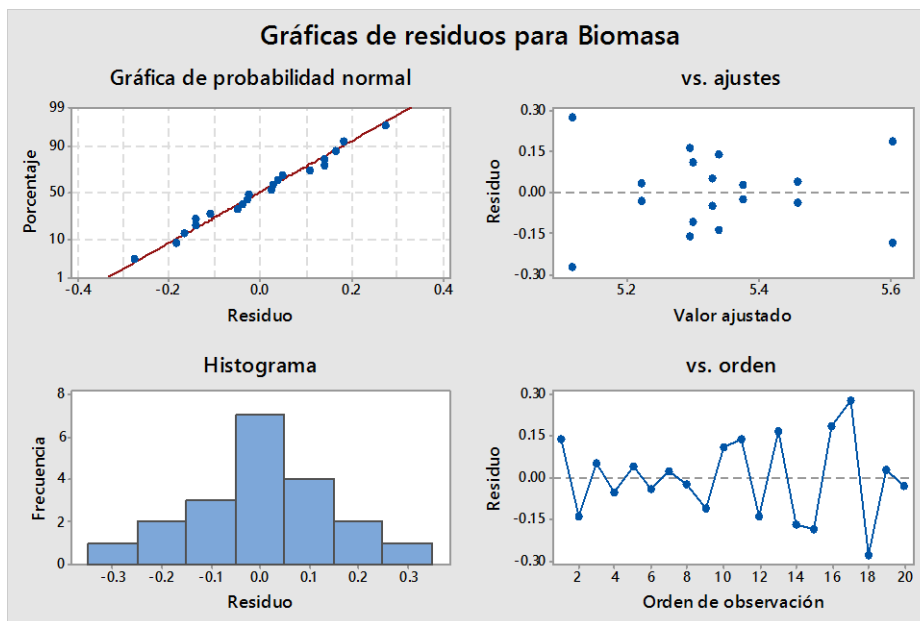
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	9	0.30912	0.03435	0.89	0.568
Lineal	5	0.22345	0.04469	1.15	0.395
sustrato	1	0.01058	0.01058	0.27	0.613
%sust	4	0.21287	0.05322	1.37	0.311
Interacciones de 2 términos	4	0.08567	0.02142	0.55	0.702
sustrato*%sust	4	0.08567	0.02142	0.55	0.702
Error	10	0.38800	0.03880		
Total	19	0.69712			

Resumen del modelo

	R-cuad.	R-cuad.	S	R-cuad. (ajustado)	(pred)
	0.196977	44.34%	0.00%	0.00%	

Ecuación de regresión

$$\begin{aligned}
 \text{Biomasa} = & 5.3380 + 0.0230 \text{ sustrato}_1 - 0.0230 \text{ sustrato}_2 + 0.0020 \% \text{sust}_1 - 0.0255 \% \text{sust}_2 \\
 & + 0.1945 \% \text{sust}_3 - 0.0930 \% \text{sust}_4 - 0.0780 \% \text{sust}_5 - 0.0230 \text{ sustrato} * \% \text{sust}_1 \ 1 \\
 & - 0.0055 \text{ sustrato} * \% \text{sust}_1 \ 2 - 0.0955 \text{ sustrato} * \% \text{sust}_1 \ 3 + 0.1070 \text{ sustrato} * \% \text{sust}_1 \ 4 \\
 & + 0.0170 \text{ sustrato} * \% \text{sust}_1 \ 5 + 0.0230 \text{ sustrato} * \% \text{sust}_2 \ 1 + 0.0055 \text{ sustrato} * \% \text{sust}_2 \ 2 \\
 & + 0.0955 \text{ sustrato} * \% \text{sust}_2 \ 3 - 0.1070 \text{ sustrato} * \% \text{sust}_2 \ 4 - 0.0170 \text{ sustrato} * \% \text{sust}_2 \ 5
 \end{aligned}$$



a. **Análisis de varianza ANOVA para los resultados obtenidos en la variación de concentración de la fuente de carbono para la formulación del 25% de dihidrogeno fosfato de amonio para biomasa**

Sustitución vs biomasa

ANOVA unidireccional: Biomasa vs. %sust

Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales de no hay cambios significativos en la biomasa debido a la variación en la concentración de fuente de carbono para la formulación del 25% de sustitución de extracto de levadura por dihidrogeno fosfato de amonio.
Hipótesis alterna	Por lo menos una media es diferente de existen cambios significativos en la biomasa debido a la variación en la concentración de fuente de carbono para la formulación del 25% de sustitución de extracto de levadura por dihidrogeno fosfato de amonio.
Nivel de significancia	$\alpha = 0.05$
Filas no utilizadas	8

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
%sust	5	1, 2, 3, 4, 5

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
%sust	4	0.03024	0.007560	0.52	0.728
Error	5	0.07285	0.014570		
Total	9	0.10309			

Resumen del modelo

R-cuad. R-cuad.
 S R-cuad. (ajustado) (pred)
 0.120706 29.33% 0.00% 0.00%

Medias

%sust	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
1	2	5.340	0.198	(5.121, 5.559)
2	2	5.3300	0.0707	(5.1106, 5.5494)
3	2	5.4600	0.0566	(5.2406, 5.6794)
4	2	5.3750	0.0354	(5.1556, 5.5944)
5	2	5.300	0.156	(5.081, 5.519)

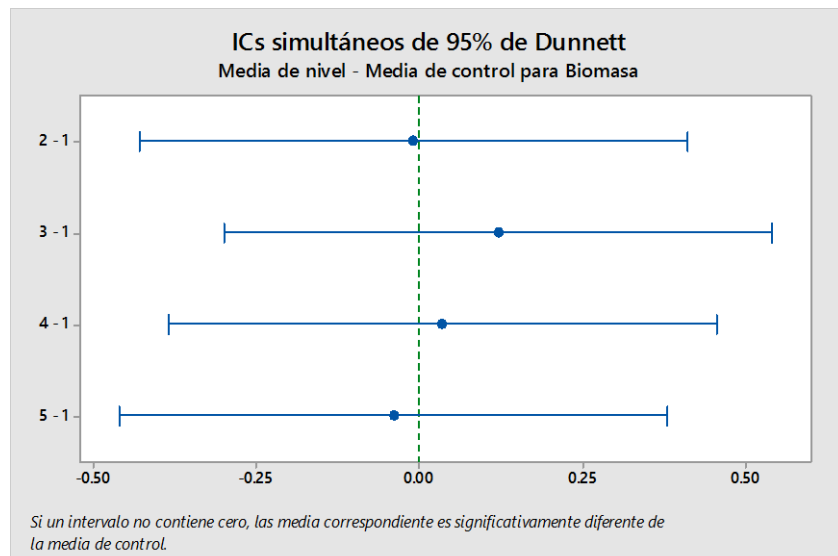
Desv.Est. agrupada = 0.120706

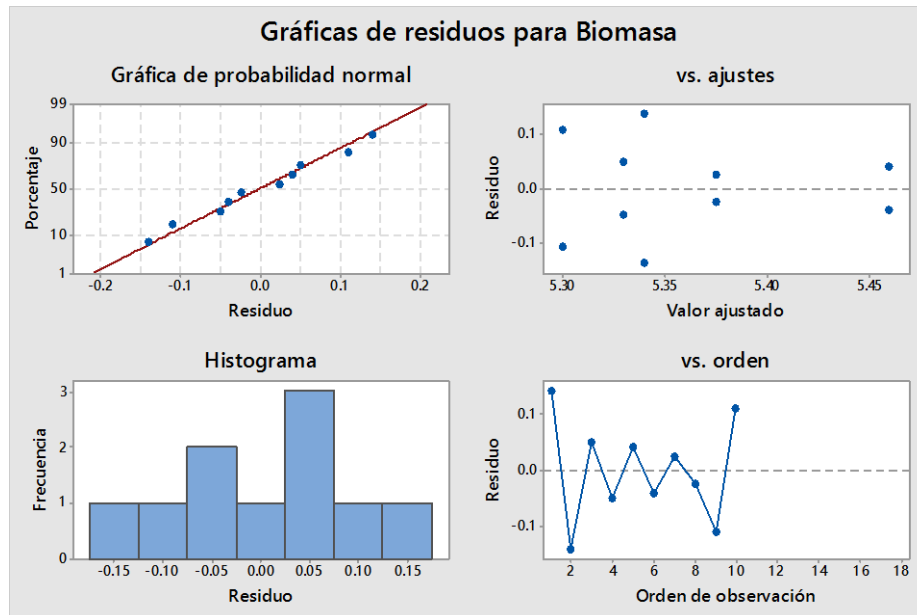
Comparación estadística ANOVA por medio de DUNNETT con un control para los resultados obtenidos en la variación de concentración de la fuente de carbono para la formulación del 25% de dihidrogeno fosfato de amonio para biomasa

Agrupar información utilizando el método de Dunnett y una confianza de 95%

%sust	N	Media	Agrupación
1 (control)	2	5.340	A
3	2	5.4600	A
4	2	5.3750	A
2	2	5.3300	A
5	2	5.300	A

Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel de control.





b. Análisis estadístico ANOVA para los resultados obtenidos en la variación de concentración de la fuente de carbono para la formulación del 50% de sustitución de extracto de levadura por dihidrogeno fosfato de amonio para biomasa.

Sustitución vs biomasa

ANOVA unidireccional: Biomasa vs. %sust

Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales de no hay cambios significativos en la biomasa debido a la variación en la concentración de fuente de carbono para la formulación del 50% de sustitución de extracto de levadura por dihidrogeno fosfato de amonio.
Hipótesis alterna	Por lo menos una media es diferente de existen cambios significativos en la biomasa debido a la variación en la concentración de fuente de carbono para la formulación del 50% de sustitución de extracto de levadura por dihidrogeno fosfato de amonio.
Nivel de significancia	$\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
%sust	5	1, 2, 3, 4, 5

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
% sust	4	0.2683	0.06708	1.06	0.461
Error	5	0.3151	0.06303		
Total	9	0.5835			

Resumen del modelo

R-cuad. R-cuad.
 S R-cuad. (ajustado) (pred)
 0.251058 45.99% 2.77% 0.00%

Medias

%sust	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
1	2	5.340	0.198	(4.884, 5.796)
2	2	5.295	0.233	(4.839, 5.751)
3	2	5.605	0.262	(5.149, 6.061)
4	2	5.115	0.389	(4.659, 5.571)
5	2	5.2200	0.0424	(4.7637, 5.6763)

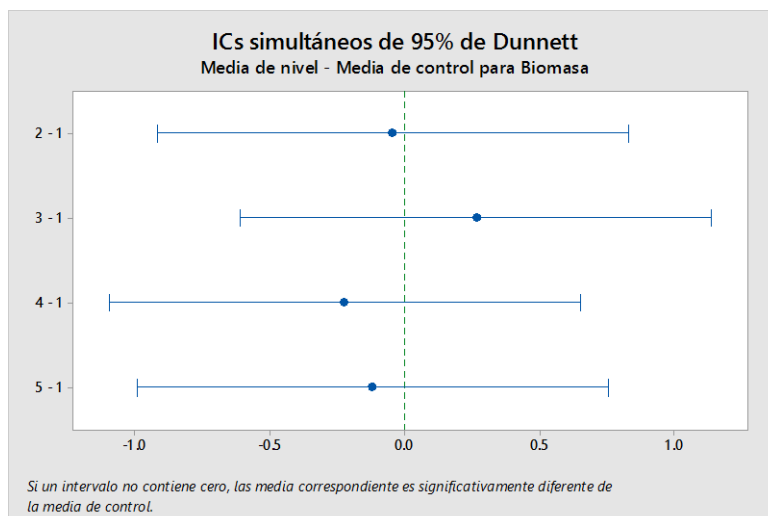
Desv.Est. agrupada = 0.251058

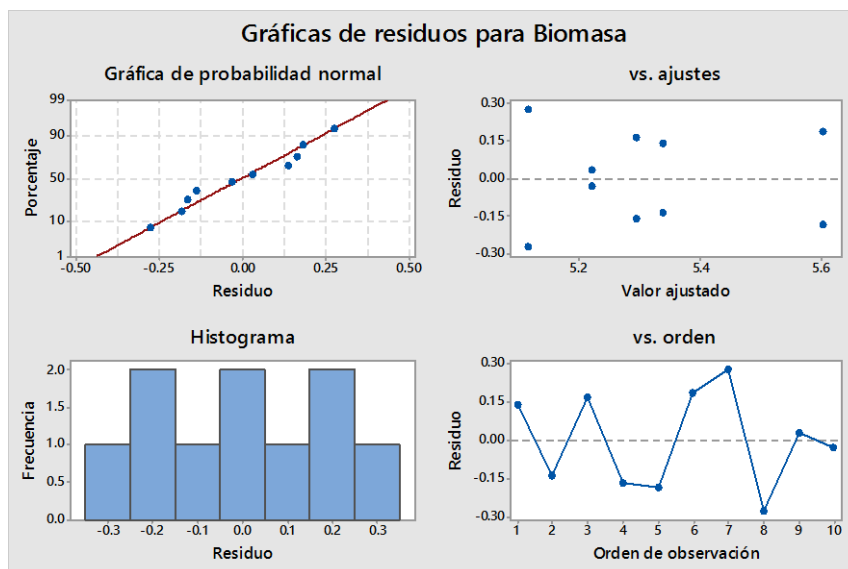
Comparación estadística ANOVA por medio de DUNNETT con un control para los resultados obtenidos en la variación de concentración de la fuente de carbono para la formulación del 50% de sustitución de extracto de levadura por dihidrogeno fosfato de amonio para biomasa.

Agrupar información utilizando el método de Dunnett y una confianza de 95%

%sust	N	Media	Agrupación
1 (control)	2	5.340	A
3	2	5.605	A
2	2	5.295	A
5	2	5.2200	A
4	2	5.115	A

Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel de control.





ANÁLISIS GENERAL PARA ACTIVIDAD

Regresión factorial general: Actividad vs. sustrato, %sust

Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales de la variación de la fuente de carbono no afecta significativamente la actividad enzimática.
Hipótesis alterna	Por lo menos una media es diferente de la variación de la fuente de carbono afecta significativamente la actividad enzimática.

Información del factor

Factor Niveles Valores
 sustrato 2 1, 2
 %sust 5 1, 2, 3, 4, 5

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	9	122.284	13.5871	83.13	0.000
Lineal	5	114.013	22.8026	139.51	0.000
sustrato	1	4.186	4.1861	25.61	0.000
%sust	4	109.827	27.4568	167.99	0.000
Interacciones de 2 términos	4	8.271	2.0677	12.65	0.001
sustrato*%sust	4	8.271	2.0677	12.65	0.001
Error	10	1.634	0.1634		
Total	19	123.918			

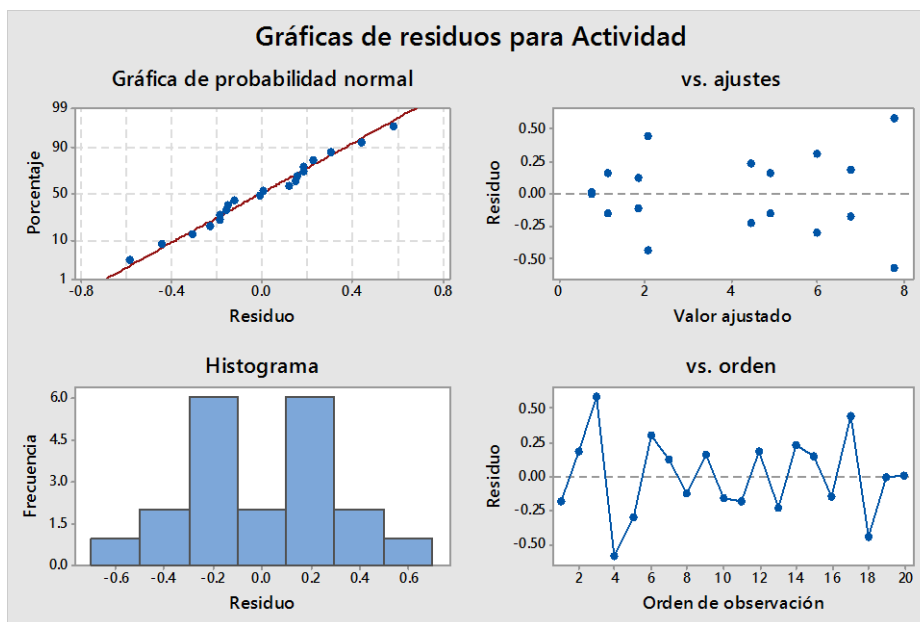
Resumen del modelo

R-cuad. R-cuad.
 S R-cuad. (ajustado) (pred)

0.404283 98.68% 97.49% 94.72%

Ecuación de regresión

$$\begin{aligned}
 \text{Actividad} = & 4.2515 + 0.4575 \text{ sustrato_1} - 0.4575 \text{ sustrato_2} + 2.523 \% \text{ sust_1} + 1.866 \% \text{ sust_2} \\
 & + 1.206 \% \text{ sust_3} - 2.299 \% \text{ sust_4} - 3.297 \% \text{ sust_5} - 0.458 \text{ sustrato} * \% \text{ sust_1 1} \\
 & + 1.210 \text{ sustrato} * \% \text{ sust_1 2} + 0.080 \text{ sustrato} * \% \text{ sust_1 3} - 0.560 \text{ sustrato} * \% \text{ sust_1 4} \\
 & - 0.272 \text{ sustrato} * \% \text{ sust_1 5} + 0.458 \text{ sustrato} * \% \text{ sust_2 1} - 1.210 \text{ sustrato} * \% \text{ sust_2 2} \\
 & - 0.080 \text{ sustrato} * \% \text{ sust_2 3} + 0.560 \text{ sustrato} * \% \text{ sust_2 4} + 0.272 \text{ sustrato} * \% \text{ sust_2 5}
 \end{aligned}$$



c. **Análisis estadístico ANOVA por medio de Dunnett para los resultados obtenidos en la variación de concentración de la fuente de carbono para la formulación del 25% de sustitución de extracto de levadura por dihidrogeno fosfato de amonio para actividad enzimática de transferencia**

Sustitución vs biomasa

ANOVA unidireccional: Biomasa vs. %sust

Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales de no hay cambios significativos en la actividad enzimática debido a la variación en la concentración de fuente de carbono para la formulación del 25% de sustitución de extracto de levadura por dihidrogeno fosfato de amonio.
Hipótesis alterna	Por lo menos una media es diferente de existen cambios significativos en la actividad enzimática debido a la variación en la concentración de fuente de carbono para la formulación del 25% de sustitución de extracto de levadura por dihidrogeno fosfato de amonio.
Nivel de significancia	$\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
%sust	5	1, 2, 3, 4, 5

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
%sust	4	72.591	18.1478	89.05	0.000
Error	5	1.019	0.2038		
Total	9	73.610			

Resumen del modelo

R-cuad. R-cuad.
 S R-cuad. (ajustado) (pred)
 0.451431 98.62% 97.51% 94.46%

Medias

%sust	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
1	2	6.775	0.262	(5.954, 7.596)
2	2	7.785	0.827	(6.964, 8.606)
3	2	5.995	0.431	(5.174, 6.816)
4	2	1.850	0.170	(1.029, 2.671)
5	2	1.140	0.226	(0.319, 1.961)

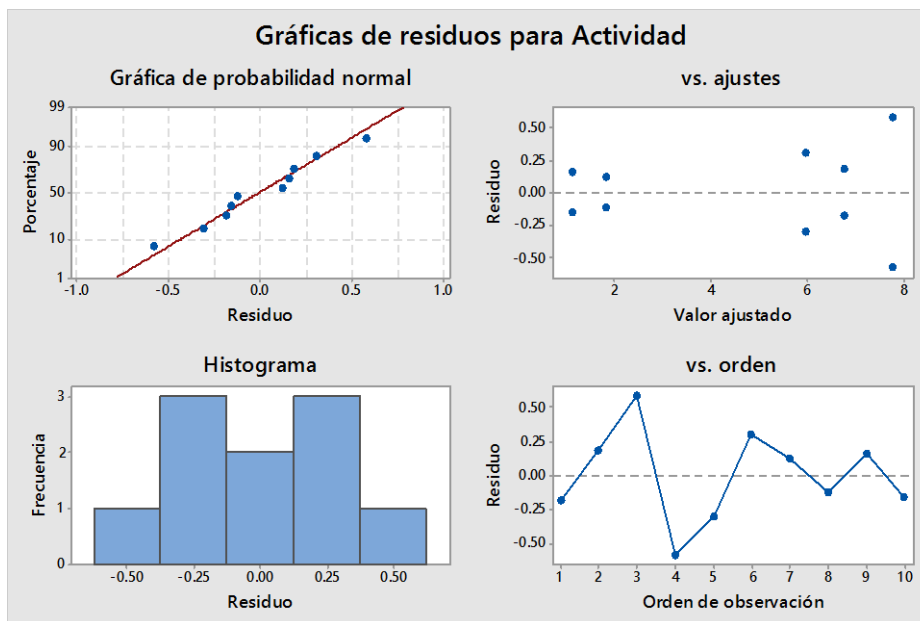
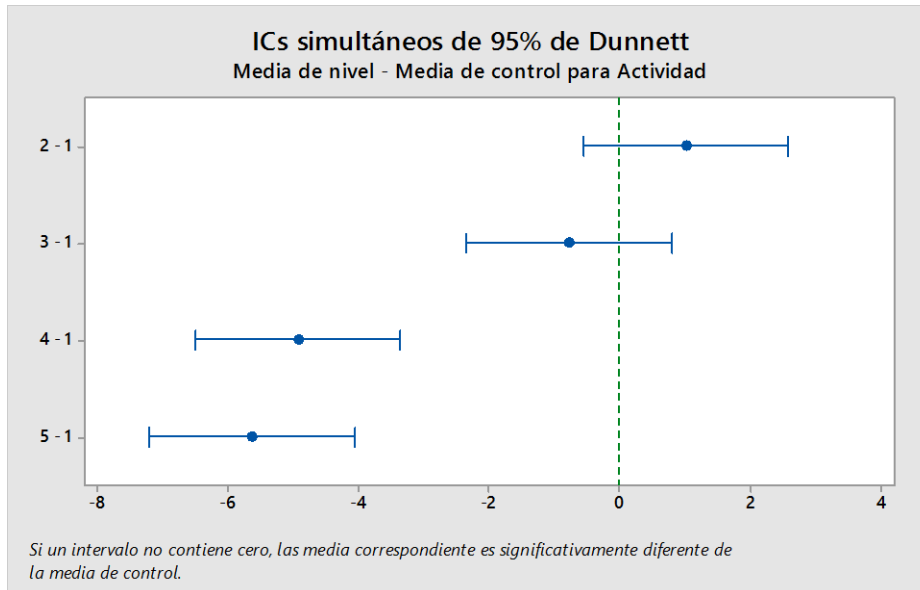
Desv.Est. agrupada = 0.451431

Comparación estadística ANOVA por medio de DUNNETT con un control para los resultados obtenidos en la variación de concentración de la fuente de carbono para la formulación del 25% de sustitución de extracto de levadura por dihidrogeno fosfato de amonio para actividad enzimática de transferencia

Agrupar información utilizando el método de Dunnett y una confianza de 95%

%sust	N	Media	Agrupación
1 (control)	2	6.775	A
2	2	7.785	A
3	2	5.995	A
4	2	1.850	
5	2	1.140	

Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel de control.



d. Análisis estadístico ANOVA por medio de Dunnett con control para los resultados obtenidos en la variación de concentración de la fuente de carbono para la formulación del 50% de sustitución de extracto de levadura por dihidrogeno fosfato de amonio para actividad enzimática de transferencia

Sustitución vs biomasa

ANOVA unidireccional: Biomasa vs. %sust

Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales no hay cambios significativos en la actividad enzimática debido a la variación en la concentración de fuente de carbono para la formulación del 50% de sustitución de extracto de levadura por dihidrogeno fosfato de amonio.
Hipótesis alterna	Por lo menos una media es diferente Por lo menos una media es diferente de existen cambios significativos en la actividad enzimática debido a la variación en la concentración de fuente de carbono para la formulación del 50% de sustitución de extracto de levadura por dihidrogeno fosfato de amonio.
Nivel de significancia	$\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
%sust	5	1, 2, 3, 4, 5

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
%sust	4	45.5065	11.3766	92.42	0.000
Error	5	0.6155	0.1231		
Total	9	46.1220			

Resumen del modelo

R-cuad. R-cuad.
S R-cuad. (ajustado) (pred)
0.350856 98.67% 97.60% 94.66%

Medias

%sust	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
1	2	6.775	0.262	(6.137, 7.413)
2	2	4.450	0.325	(3.812, 5.088)
3	2	4.920	0.212	(4.282, 5.558)
4	2	2.055	0.629	(1.417, 2.693)
5	2	0.7700	0.0141	(0.1323, 1.4077)

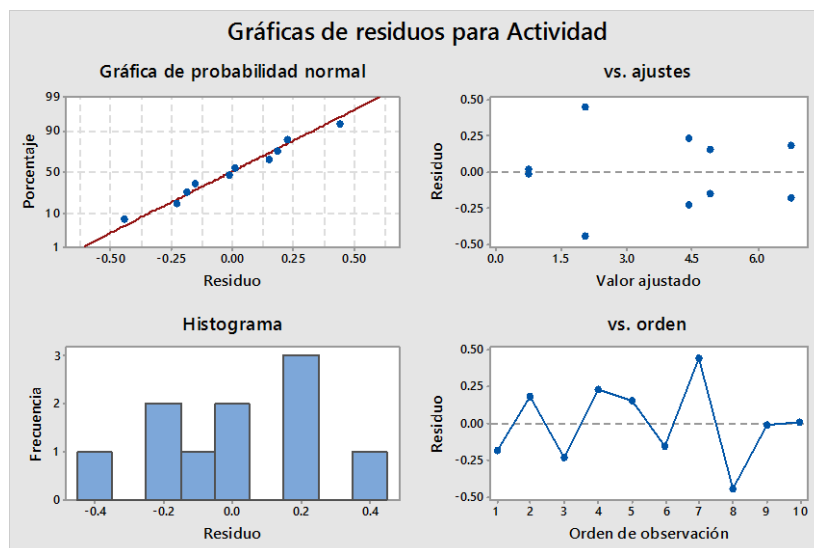
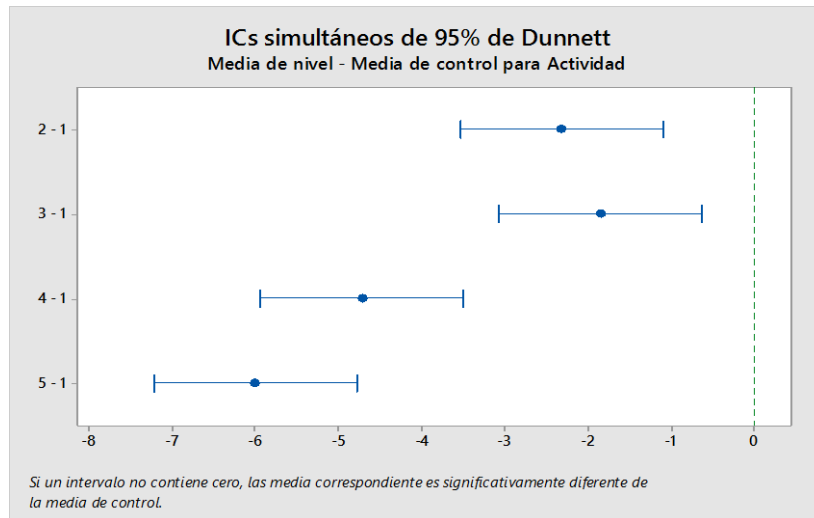
Desv.Est. agrupada = 0.350856

Comparación estadística ANOVA por medio de DUNNETT con un control para los resultados obtenidos en la variación de concentración de la fuente de carbono para la formulación del 50% de sustitución de extracto de levadura por dihidrogeno fosfato de amonio para actividad enzimática de transferencia

Agrupar información utilizando el método de Dunnett y una confianza de 95%

%sust	N	Media	Agrupación
1 (control)	2	6.775	A
3	2	4.920	
2	2	4.450	
4	2	2.055	
5	2	0.7700	

Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel de control.



ANEXO 12

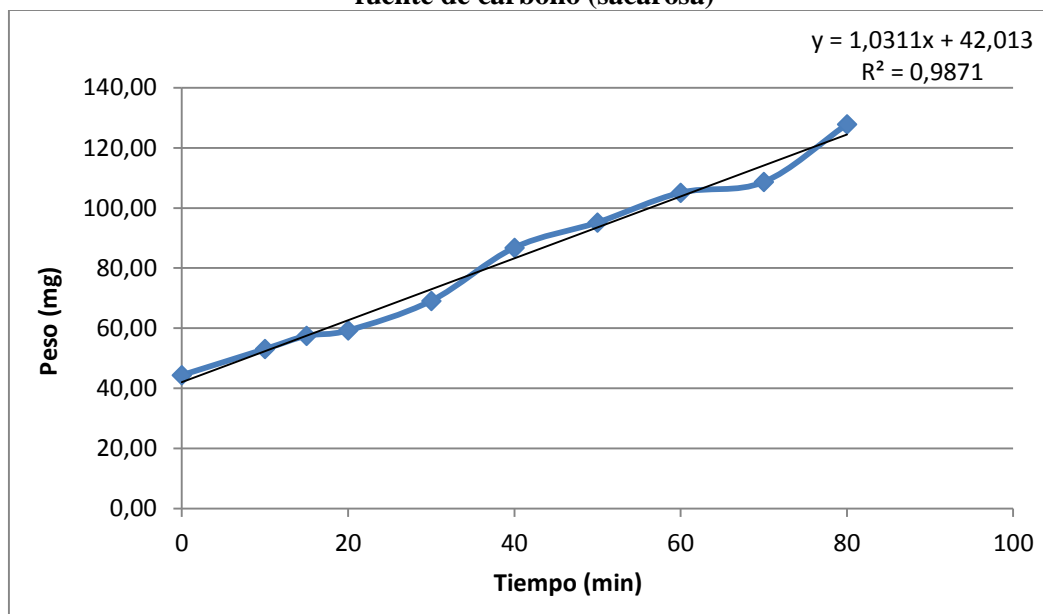
PROTOCOLO DE LA ACTIVIDAD CON EL MÉTODO DE DIGESTIÓN Y GRAVIMETRÍA DEXTRANSACARASA/SACAROSA

Pesos de la actividad con el método de digestión y gravimetría dextransacarasa/sacarosa

Relación	Tiempo (min)	Peso (mg)	Relación	Tiempo (min)	Peso (mg)	Relación	Tiempo (min)	Peso (mg)
25/5	0	44,35	25/6	0	55,5	50/5	0	46,5
25/5	10	53,05	25/6	10	57,95	50/5	10	56,4
25/5	15	57,45	25/6	15	62,8	50/5	15	46,3
25/5	20	59,25	25/6	20	62,65	50/5	20	57,95
25/5	30	69,1	25/6	30	75,55	50/5	30	63,35
25/5	40	86,8	25/6	40	25/6	50/5	40	75,9
25/5	50	104,6	25/6	50	25/6	50/5	50	79,4
25/5	60	95,2	25/6	60	25/6	50/5	60	80,85
25/5	70	108,65	25/6	70	25/6	50/5	70	84,05
25/5	80	127,85	25/6	80	25/6	50/5	80	94,2

Determinación de la actividad

Actividad para la muestra con 25% de fuente de nitrógeno (dihidrógeno fosfato de amonio) y 5% de fuente de carbono (sacarosa)

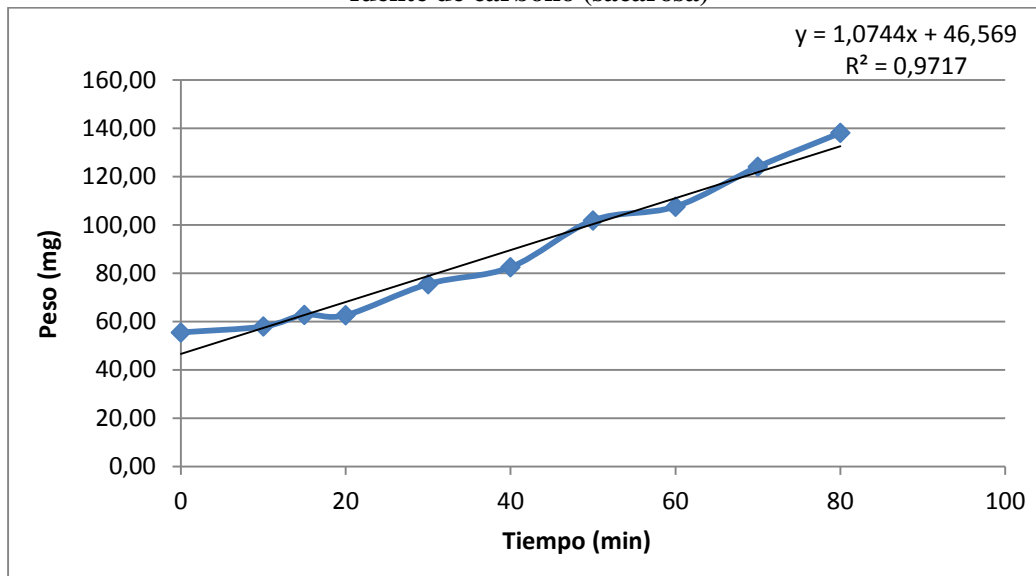


Pendiente de la curva: 1,0311 (mg/mL/min)

Actividad de la enzima

Actividad: 11,46 U/mL

Actividad para la muestra con 25% de fuente de nitrógeno (dihidrógeno fosfato de amonio) y 6% de fuente de carbono (sacarosa)

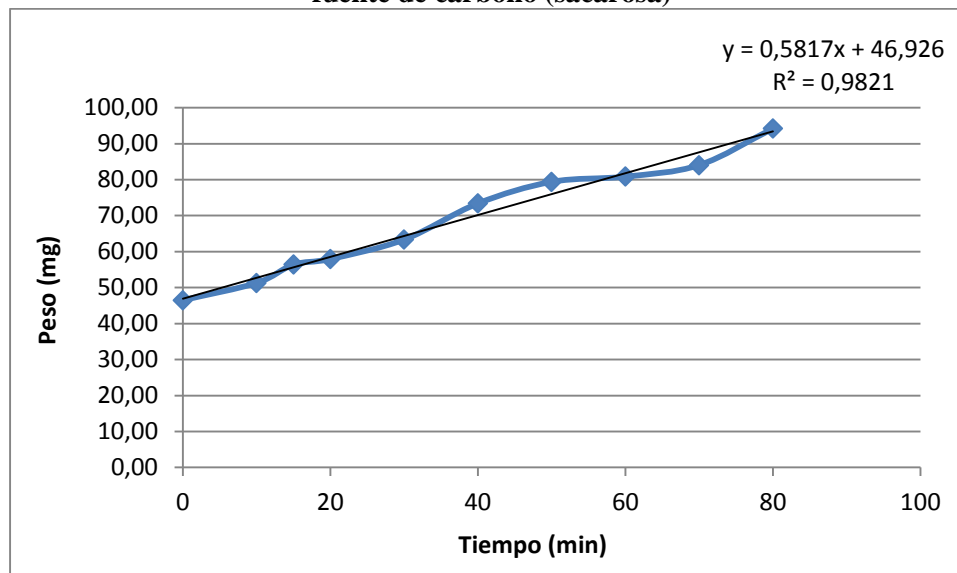


Pendiente de la curva: 1,0744 (mg/mL/min)

Actividad de la enzima

Actividad: 11,94 U/mL

Actividad para la muestra con 50% de fuente de nitrógeno (dihidrógeno fosfato de amonio) y 5% de fuente de carbono (sacarosa)



Pendiente de la curva: 0,5817 (mg/mL/min)

Actividad de la enzima

Actividad: 6,46 U/mL