



CERELA



CONICET

Producción de Manitol por Bacterias Lácticas

Tesis Doctoral

Lic. Maria Eugenia Ortiz

Año 2014



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMÁN
FACULTAD DE BIOQUÍMICA QUÍMICA Y FARMACIA
Ayacucho 471 - T. E. 0054 381 4107215 - FAX 0054 381 4248169
T4000CAN - San Miguel de Tucumán - República Argentina



"Cien años iluminando el pasado, cien años proyectando el futuro"

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMÁN

FACULTAD DE BIOQUÍMICA, QUÍMICA Y FARMACIA



PRODUCCIÓN DE MANITOL POR BACTERIAS LÁCTICAS

Lic. Maria Eugenia Ortiz

Año 2014



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMAN
FACULTAD DE BIOQUIMICA QUIMICA Y FARMACIA
Ayacucho 471 - T. E. 0054 381 4107215 - FAX 0054 381 4248169
T4000CAN - San Miguel de Tucumán - República Argentina

100 | **UNT**
1914-2014

"Cien años iluminando el pasado, cien años proyectando el futuro"

AUTORIDADES

HONORABLE CONSEJO DIRECTIVO

Dra. Gabriela del Valle Perdigón

Dra. María Inés Gómez

Dra. María Eugenia Mónaco

Mag. Adriana Correa Zeballos

Máster María Regina Rintoul

Bioq. Cecilia Hebe Noemí Orphée

Bioq. Graciela Esther Borda

Sr. Mario Luis Rodríguez

Sr. Hugo Vaca

Sr. José María Sánchez

Srta. Anabel Noelí Garay Maguna

DECANA

Dra. Silvia Nelina González

VICE-DECANO

Dr. Edgardo Hugo Cutin

SECRETARIA DE ASUNTOS ACADEMICOS

Dra. Marta Elena Cecilia

JEFA DEL DEPARTAMENTO POSGRADO

Lic. Marta Quinteros



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMAN
FACULTAD DE BIOQUIMICA QUIMICA Y FARMACIA
Ayacucho 471 - T. E. 0054 381 4107215 - FAX 0054 381 4248169
T4000CAN - San Miguel de Tucumán - República Argentina



"Cien años iluminando el pasado, cien años proyectando el futuro"

DEPARTAMENTO DE POSGRADO

AUTORIDADES

DIRECTORA

Dra. Florencia Fagalde

CONSEJO TITULAR

Dra. Florencia Fagalde

Dra. María Inés Ybarra

Dra. Adriana María Sales

Dra. Nancy Roxana Vera

Dra. María Eugenia Bibas Bonet

Dra. Rosana Chehín

CONSEJO SUPLENTE

Dra. Sonia Beatriz Díaz

Dra. María Cristina Rubio de Recúpero



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMAN
FACULTAD DE BIOQUIMICA QUIMICA Y FARMACIA
Ayacucho 471 - T. E. 0054 381 4107215 - FAX 0054 381 4248169
T4000CAN - San Miguel de Tucumán - República Argentina



"Cien años iluminando el pasado, cien años proyectando el futuro"

**TRABAJO DE POSTGRADO PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO ACADÉMICO
SUPERIOR DE DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

CARRERA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Acreditado y Categorizado A ante la
Comisión Nacional de Acreditación Universitaria (CONEAU)
Resolución N°: 615/07

Acreditado y Categorizado A ante la
Comisión Nacional de Acreditación Universitaria (CONEAU)
Resolución N°: Resolución 750 - CONEAU-13

Director

Dr. Atilio Pedro Castagnaro

Vice-Directora

Dra. Viviana Andrea Rapisarda

Comité Académico

Dr. Alfredo Grau

Dr. Raúl Pedraza

Dra. Lucia Clapz

Dra. Silvina Fadda



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMAN
FACULTAD DE BIOQUIMICA QUIMICA Y FARMACIA
Ayacucho 471 - T. E. 0054 381 4107215 - FAX 0054 381 4248169
T4000CAN - San Miguel de Tucumán - República Argentina



"Cien años iluminando el pasado, cien años proyectando el futuro"

TRABAJO DE POSGRADO TITULADO

PRODUCCIÓN DE MANITOL POR BACTERIAS LÁCTICAS

TESISTA

Lic. en Biotecnología Maria Eugenia Ortiz

DIRECTORA

Dra. Fernanda Mozzi

DIRECTOR ASOCIADO

Dr. Raúl R. Raya

COMISIÓN DE SUPERVISIÓN

Dra. Marcela Ferrero

Dra. Lucila Saavedra



Este trabajo de Tesis Doctoral se financió a través de becas y subsidios provistos por las siguientes instituciones: el **Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)**, la **Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCYT)** y el **Consejo de Investigaciones de la Universidad Nacional de Tucumán (CIUNT)**.

Esta Tesis Doctoral se desarrolló en el **Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA)**, dependiente de CONICET, de la Fundación Miguel Lillo y de la Fundación para la Educación, la Ciencia y la Cultura (FECIC).

Parte de los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis Doctoral dieron lugar a las siguientes publicaciones y comunicaciones científicas:

Publicaciones en revistas científicas con referato

Ortiz ME, Bleckwedel J, Raya RR, Mozzi F (2013) "Biotechnological and *in situ* food production of polyols by lactic acid bacteria" *Applied Microbiology and Biotechnology* 97:4713-4726.

Ortiz ME, Fornaguera MJ, Raya RR, Mozzi F (2012) "*Lactobacillus reuteri* CRL 1101 highly produces mannitol from sugarcane molasses as carbon source". *Applied Microbiology and Biotechnology* 95(4):991-999.

Mozzi F, **Ortiz ME**, Bleckwedel J, De Vuyst L, Pescuma M (2012) "Metabolomics as a tool for the comprehensive understanding of fermented and functional foods with lactic acid bacteria". *Food Research International*, special issue Foodomics 54(1):1152–1161.

Comunicaciones Científicas

2014. **Ortiz ME**, Bleckwedel J, Hébert EM, Ferranti P, Picariello G, Raya RR, Mozzi F "Fructose induces gene expression of mannitol 2-dehydrogenase of *Lactobacillus reuteri* CRL 1101". 11th Symposium on Lactic Acid Bacteria. Del 31 de Agosto al 04 de Septiembre. Egmond aan Zee, Holanda.

2013. **Ortiz ME**, Raya RR, Mozzi F "Optimization of mannitol production by *Lactobacillus reuteri* CRL 1101 using a molasses-based culture medium at controlled-pH fermentations". IV Simposio International de Bacterias Lácticas (SIBAL). Del 16 al 18 de Octubre. San Miguel de Tucumán, Argentina.

2013. **Ortiz ME**, Raya RR, Mozzi F. "Mannitol production and mannitol 2-dehydrogenase activity are induced by fructose during early growth of *Lactobacillus reuteri* CRL 1101 in rich and chemically defined media". SfAM Summer conference 2013. Lactic acid bacteria and *Bifidobacterium*. Actinobacteria. Del 01 al 04 de Julio. Cardiff, Gales, Reino Unido.

2012. **Ortiz ME**, Bleckwedel J, Raya RR, Mozzi F. "Mannitol 2-dehydrogenase activity at different growth phases in *Lactobacillus reuteri* CRL 1101". XLVIII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Del 29 de Octubre al 01 de Noviembre. Mendoza, Argentina.

2012. **Ortiz ME**, Vignolo G, Raya RR, Mozzi F. "Mannitol production by *Lactobacillus reuteri* CRL 1101 using a low-cost culture medium". 23th INTERNATIONAL ICFMH SYMPOSIUM FoodMicro 2012, Global Issues in Food Microbiology. Del 03 al 07 de Septiembre. Estambul, Turquía.

2011. **Ortiz ME**, Raya RR, Mozzi F. "Effect of the growth phase on the biotechnological mannitol production by *Lactobacillus reuteri* CRL 1101". 10th Symposium on Lactic Acid Bacteria. Del 28 Agosto al 01 de Septiembre. Egmond aan Zee, Holanda.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Fernanda Mozzi, mi directora de Tesis, por confiar en mí y darme la oportunidad de iniciar este trabajo aún cuando la Microbiología era nueva para mí; por su honestidad, su gran sentido de la responsabilidad y su fuerte compromiso con cada uno de nosotros. Recuerdo que aún en tus momentos más difíciles nos diste lo mejor de vos y estuviste presente para lo que necesitamos... *Gracias Fernanda por tu asistencia permanente, por incentivar en nosotros el trabajo en equipo y por tu interés en lograr que éste sea realmente un beneficio para todos.*

Al Dr. Raúl Raya, mi director de Tesis, por su gran generosidad y sentido del humor que llega a todos los que compartimos con Ud. la jornada laboral... los que tuvimos la dicha y el privilegio de tenerlo como director, sabemos de su pasión por la Ciencia y sus ganas de transmitirla, siempre generando ideas, desafíos y alentándonos a seguir adelante... *Gracias Dr. por su calidez y su exigencia disfrazada de humor que me incentivó siempre a ir un poco más allá.*

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por el otorgamiento de las becas que posibilitaron la realización de esta Tesis.

A la Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, a la Universidad Nacional de Tucumán y al Estado Argentino por brindarme la posibilidad de realizar mis estudios de grado y posgrado de forma gratuita... *Me enorgullece pertenecer a un país donde la educación es gratuita y universal en todos los niveles.*

A la Dra. Marcela Ferrero y a la memoria del Dr. Fernando Sesma, miembros de mi Comisión de Supervisión, por sus valiosos aportes durante el desarrollo de esta Tesis.

A la Dra. Lucila Saavedra, miembro de mi Comisión de Supervisión, por su predisposición y por su valiosa contribución durante la lectura del manuscrito... *Gracias Lulú por tu entusiasmo, tu sencillez y tu calidez humana.*

A la Dra. Silvina Fadda, por su generosa asistencia y colaboración en los ensayos de proteómica... *Gracias Sil por tu trato tan cálido que hizo que el trabajo en equipo sea muy agradable y fructífero.*

A mis compañeras del Laboratorio de Tecnología y Desarrollo:

- Mica Pescuma, por su permanente asistencia desde mis primeros experimentos hasta el final de mi Tesis y por transmitirme día a día su entusiasmo por la investigación científica... *Gracias por tu compañerismo y tu ayuda desinteresada.*
- Juli Bleckwedel y Lu Ruiz Rodríguez, por los trabajos de laboratorios compartidos, por sus ganas, su energía positiva y su gran capacidad de trabajo... *Gracias por su amistad, aprendí mucho de ustedes.*

- Anto Rodríguez de Olmos, Jony Laiño, Male Juárez Del Valle y Sil Del Carmen, por sus consejos, por permitirme aprender de su capacidad para sobreponerse a los malos momentos y seguir adelante siempre, por demostrarme que —tarde o temprano— las cosas que deseamos y por las que trabajamos, llegan... *Gracias por su apoyo y su predisposición para cada cosa que necesité de ustedes.*
- Lore Carrizo, Ale Correa Deza, Lu Brown y Jose Villegas, por su apoyo y predisposición cuando las necesité, por las anécdotas y las sonrisas que siempre nos arrancaron a todos... *Gracias por su afecto y colaboración.*
- Lu Mendoza y Migue Fernández de Ulivarri, por su amistad y su ayuda tanto a nivel laboral como personal... *Gracias por sus actos de cariño y su ayuda desinteresada.*
- Yani Bustos y Andre Dallagnol, por su cálido recibimiento en mis primeros años en el laboratorio, por las charlas y discusiones académicas que tanto me enseñaron y los momentos compartidos fuera del laboratorio que me permitieron descubrir a personas excepcionales... *Gracias por sus consejos y por brindarme su amistad que, a pesar del tiempo y la distancia, son tan especiales para mí.*

A mis compañeras del Laboratorio de *Genética y Biología Molecular*:

- Juli Bonacina y Nadia Suárez, por su colaboración desinteresada y su gran capacidad de trabajo... *Gracias por su sentido del humor, por su amistad y por tanta generosidad cuando necesité su ayuda.*
- Ceci Aristimuño y Lucre Terán, por su sencillez, su calidez y su alegría por los logros ajenos como si fueran propios... *Gracias por demostrarme que hay personas que no tienen maldad.*

Con todos ustedes compartí la mayor parte de mi tiempo en estos últimos 5 años y se convirtieron en parte de mi vida diaria, me apoyaron y alentaron a cada paso y formamos un hermoso grupo humano... *Gracias por tantas charlas, mates, alegrías y tristezas compartidas.*

A mis compañeros de otros laboratorios de Cerela: María José Fornaguera, Mariana Pérez Ibarreche, Jaime Babot, Poly Leccese y Ceci Haro... *Gracias por su ayuda y por brindarme su tiempo y su amistad.*

A Mabel Taljuk, por su calidad profesional y humana, por su apoyo y ayuda incondicional... *Gracias por tus palabras de aliento y tu invaluable asistencia en la búsqueda bibliográfica.*

A Nelly Taljuk, Ma. Luisa Ragout y Marta Medici, por su calidez y cariño de todos los días... *Gracias por hacer que la jornada laboral siempre comience y termine con una sonrisa.*

A todos los que de alguna u otra manera colaboraron en el desarrollo de este trabajo, en especial Elena Bru, Mario Vidal, Marisa Garro, Yoly Borchia, Vicky Martos y Jorge Palacios.

A mis padres, Hebe y Luis, por su esfuerzo y su dedicación y por sus renunciaciones y postergaciones para que mis hermanos y yo tengamos las mejores posibilidades; por todo el amor y el cariño que nos brindan día a día; por hacer de nosotros personas de bien, guiándonos con la palabra y principalmente con el ejemplo por el camino del trabajo, la honestidad y la calidad humana; por respetar y apoyar siempre nuestras dediciones... *Gracias por tanto amor, los adoro.*

A mis hermanos, Pablo y Rafael, por estar siempre pendientes de mi bienestar... *Gracias por cuidarme y brindarme su amistad.*

A Javi, mi esposo, mi compañero en la vida y en la profesión, por tu dedicación a la familia y al trabajo, por el esfuerzo, el empuje y la pasión que ponés en cada cosa que emprendemos, por incentivar me a cada momento... *Gracias por tu amor, tu honestidad y tu generosidad... Te admiro y te amo.*

A toda mi familia, abuelos, tíos y primos, por su apoyo y comprensión permanentes... *Gracias por el cariño y la contención, tan importantes para mí.*

A mi suegra Martha, a mi cuñado Ariel y a Naty, por su cariño, su amistad y su apoyo en todos nuestros proyectos profesionales y personales... *Gracias adoptarme con tanta naturalidad y calidez como parte de su familia.*

A mis amigos Vane García, Guille Marcial y Coni Busso, por acompañarme en los buenos y malos momentos... *Gracias por ser mis hermanos del corazón.*

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| RESUMEN | 1 |
| ABREVIATURAS, SIGLAS Y SÍMBOLOS..... | 4 |
| 1. INTRODUCCIÓN GENERAL | 6 |
| 1.1. POLIOLES..... | 6 |
| 1.1.1. Los alditoles..... | 7 |
| 1.1.1.a. Propiedades físico-químicas..... | 7 |
| 1.1.1.b. Características generales..... | 8 |
| 1.1.1.c. Alditoles de interés industrial..... | 10 |
| 1.2. MANITOL | 13 |
| 1.2.1. Fuentes naturales de manitol..... | 13 |
| 1.2.2. Propiedades generales y aplicaciones | 14 |
| 1.2.2.a. Industria de los alimentos | 14 |
| 1.2.2.b. Industria farmacéutica | 14 |
| 1.2.2.c. Industria química | 15 |
| 1.2.2.d. Medicina | 15 |
| 1.2.2.e. Otros usos..... | 15 |
| 1.2.3. Legislación Argentina sobre el uso del manitol | 16 |
| 1.3. PROCESOS DE PRODUCCIÓN DE MANITOL | 17 |
| 1.3.1. Producción química..... | 17 |
| 1.3.2. Producción enzimática..... | 18 |
| 1.3.3. Producción microbiana..... | 20 |
| 1.4. PRODUCCIÓN DE MANITOL POR MICROORGANISMOS | 21 |
| 1.4.1. Hongos filamentosos..... | 22 |
| 1.4.2. Levaduras | 23 |
| 1.4.3. Bacterias..... | 24 |
| 1.5. LAS BACTERIAS LÁCTICAS..... | 25 |
| 1.5.1. Generalidades | 25 |
| 1.5.2. Metabolismo de hidratos de carbono en BL..... | 28 |
| 1.5.2.a. BL homofermentativas | 28 |
| 1.5.2.b. BL heterofermentativas | 31 |
| 1.5.3. Producción biotecnológica de manitol por BL heterofermentativas..... | 33 |
| 2. OBJETIVOS | 36 |
| Objetivo General..... | 36 |
| Objetivos Específicos..... | 36 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS | 37 |
| 3.1. CEPA EN ESTUDIO | 37 |
| 3.1.1. Origen..... | 37 |
| 3.1.2. Preservación..... | 37 |
| 3.1.3. Propagación | 37 |
| 3.2. MEDIOS DE CULTIVO | 38 |
| 3.2.1. Medio Protector LEL-Glicerol..... | 38 |
| 3.2.2. Caldo MRS..... | 38 |
| 3.2.3. Medio MRS _{Mel} | 39 |
| 3.2.3.a. Preparación de solución madre de melaza al 20% (p/v) | 39 |
| 3.2.3.b. Preparación del medio MRS _{Mel} | 39 |
| 3.2.4. Medio químicamente definido: CDM..... | 39 |
| 3.3. FERMENTACIONES..... | 42 |
| 3.3.1. Efecto de las condiciones de cultivo en la producción de manitol..... | 42 |
| 3.3.1.a. Tipo y concentración de la fuente de carbono | 42 |
| 3.3.1.b. Temperatura de incubación | 42 |

| | |
|---|----|
| 3.3.1.c. Agitación de los cultivos | 42 |
| 3.3.1.d. Fase de crecimiento y tiempo de fermentación | 43 |
| 3.3.2. Formulación de un medio de cultivo minimizado empleando una fuente de carbono alternativa | 44 |
| 3.3.2.a. Efecto de sales presentes en el medio MRS sobre el crecimiento celular..... | 44 |
| 3.3.2.b. Crecimiento celular en medios minimizados conteniendo glucosa como fuente de carbono..... | 44 |
| 3.3.2.c. Crecimiento celular y producción de manitol en medios minimizados conteniendo melaza como fuente de carbono | 45 |
| 3.3.3. Optimización de la producción de manitol en medio MLC a pH controlado | 46 |
| 3.3.3.a. Fermentaciones a pH controlado | 46 |
| 3.3.3.b. Efecto de la biomasa inicial sobre la producción de manitol..... | 47 |
| 3.3.4. Cálculo de los parámetros de fermentación..... | 48 |
| 3.3.5. Análisis estadísticos | 49 |
| 3.3.6. Aislamiento del manitol producido por <i>L. reuteri</i> CRL 1101 | 49 |
| 3.4. DETERMINACIÓN DE AZÚCARES, ÁCIDOS ORGÁNICOS Y ETANOL POR HPLC..... | 50 |
| 3.4.1. Desproteínización de muestras para determinación de azúcares..... | 50 |
| 3.4.2. Desproteínización de muestras para determinación de ácidos orgánicos y etanol . | 51 |
| 3.4.3. Determinación de azúcares residuales, manitol, ácidos orgánicos y etanol..... | 51 |
| 3.5. ACTIVIDAD MANITOL 2-DESHIDROGENASA (MDH)..... | 52 |
| 3.5.1. Obtención de extractos proteicos intracelulares | 52 |
| 3.5.2. Determinación de la actividad específica de la enzima MDH..... | 52 |
| 3.6. TÉCNICAS GENERALES DE BIOLOGÍA MOLECULAR..... | 53 |
| 3.6.1. Aislamiento de ADN cromosómico | 53 |
| 3.6.2. PCR convencional..... | 54 |
| 3.6.3. Electroforesis de ADN en geles de agarosa..... | 54 |
| 3.7. EXPRESIÓN RELATIVA Y REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL GEN <i>mdh</i> DURANTE LA PRODUCCIÓN DE MANITOL | 55 |
| 3.7.1. Medio de cultivo y condiciones de incubación..... | 55 |
| 3.7.2. Diseño y selección de <i>primers</i> para PCR cuantitativa..... | 55 |
| 3.7.3. Aislamiento y cuantificación de ARN total..... | 56 |
| 3.7.4. Transcripción reversa. Síntesis y cuantificación de ADN complementario | 57 |
| 3.7.5. PCR cuantitativa acoplada a transcripción reversa (RT-qPCR) para la cuantificación relativa de la expresión del gen <i>mdh</i> | 58 |
| 3.8. EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS INTRACELULARES DE <i>L reuteri</i> CRL 1101 DURANTE LA PRODUCCIÓN DE MANITOL | 58 |
| 3.8.1. Medio de cultivo y condiciones de incubación..... | 58 |
| 3.8.2. Obtención de los extractos proteicos intracelulares | 59 |
| 3.8.3. Primera Dimensión: Isoelectroenfoque | 59 |
| 3.8.3.a. Preparación de la muestra | 59 |
| 3.8.3.b. Hidratación pasiva..... | 60 |
| 3.8.3.c. Isoelectroenfoque..... | 61 |
| 3.8.4. Segunda Dimensión: Electroforesis vertical en geles de poliacrilamida..... | 62 |
| 3.8.4.a. Preparación de geles de poliacrilamida..... | 62 |
| 3.8.4.b. Equilibrado de las tiras de inmobilinas | 63 |
| 3.8.4.c. Siembra de las tiras y migración..... | 64 |
| 3.8.4.d. Tinción de los geles | 64 |
| 3.8.5. Densitometría de los <i>spots</i> obtenidos por 2DE | 65 |
| 3.8.6. Identificación de <i>spots</i> por espectrometría de masas MALDI-TOF..... | 65 |
| 4. CAPÍTULO I: OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE MANITOL POR <i>Lactobacillus reuteri</i> CRL 1101..... | 66 |
| 4.1. Introducción | 66 |
| 4.2. Resultados | 68 |
| 4.2.1. Efecto del tipo y concentración de la fuente de carbono | 68 |

| | |
|--|-----|
| 4.2.1.a. Fructosa..... | 68 |
| 4.2.1.b. Mezclas de glucosa y fructosa..... | 69 |
| 4.2.1.c. Melaza de caña de azúcar..... | 72 |
| 4.2.2. Efecto de la temperatura de incubación y la agitación de los cultivos..... | 74 |
| 4.2.3. Efecto de la fase de crecimiento y el tiempo de fermentación..... | 77 |
| 4.2.4. Actividad manitol 2-deshidrogenasa..... | 80 |
| 4.3. Discusión..... | 82 |
| 4.4. Conclusiones Parciales..... | 87 |
| 5. CAPÍTULO II: PRODUCCIÓN DE MANITOL POR <i>Lactobacillus reuteri</i> CRL 1101 EN UN MEDIO DE CULTIVO MINIMIZADO..... | 88 |
| 5.1. INTRODUCCIÓN..... | 88 |
| 5.2. RESULTADOS..... | 90 |
| 5.2.1. Formulación de un medio de cultivo minimizado para la producción de manitol por <i>L. reuteri</i> CRL 1101..... | 90 |
| 5.2.1.a. Efecto de sales presentes en el caldo MRS sobre el crecimiento celular..... | 90 |
| 5.2.1.b. Crecimiento de <i>L. reuteri</i> CRL 1101 en medios minimizados conteniendo glucosa como fuente de carbono..... | 91 |
| 5.2.1.c. Crecimiento y producción de manitol por <i>L. reuteri</i> CRL 1101 en medios minimizados conteniendo melaza de caña de azúcar como fuente de carbono..... | 92 |
| 5.2.2. Optimización de la producción de manitol en medio MLC a pH controlado..... | 95 |
| 5.2.3. Actividad manitol 2-deshidrogenasa..... | 100 |
| 5.2.4. Efecto de la biomasa inicial en la producción de manitol..... | 100 |
| 5.2.5. Aislamiento de manitol producido por <i>L. reuteri</i> CRL 1101 en condiciones optimizadas..... | 103 |
| 5.3. DISCUSIÓN..... | 106 |
| 5.4. CONCLUSIONES PARCIALES..... | 110 |
| 6. CAPÍTULO III: ESTUDIOS MOLECULARES SOBRE LA PRODUCCIÓN DE MANITOL POR <i>Lactobacillus reuteri</i> CRL 1101..... | 111 |
| 6.1. INTRODUCCIÓN..... | 111 |
| 6.2. RESULTADOS..... | 115 |
| 6.2.1. Influencia de la presencia de fructosa en la actividad MDH..... | 115 |
| 6.2.2. Estudio de la expresión relativa y la regulación transcripcional del gen <i>mdh</i> en presencia de fructosa..... | 118 |
| 6.2.3. Expresión diferencial de proteínas intracelulares de <i>L. reuteri</i> CRL 1101 durante la producción de manitol mediante estudios proteómicos..... | 121 |
| 6.3. DISCUSIÓN..... | 133 |
| 6.4. CONCLUSIONES PARCIALES..... | 139 |
| CONCLUSIONES GENERALES..... | 141 |
| PROYECCIONES..... | 143 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 144 |

RESUMEN

RESUMEN

El manitol es un poliol con múltiples aplicaciones industriales siendo utilizado principalmente como edulcorante de bajas calorías en la industria alimenticia siendo aplicable en alimentos dietéticos y aptos para diabéticos. La producción industrial de manitol se lleva a cabo por reducción catalítica de mezclas de glucosa/fructosa a altas temperaturas y presiones. Este proceso es costoso y poco eficiente obteniéndose manitol junto con sorbitol en la mezcla final. Estas limitaciones alentaron el estudio de la producción biotecnológica de manitol mediante fermentaciones. Algunas BL heterofermentativas como *Lactobacillus reuteri* pueden utilizar fructosa como aceptor alternativo de electrones y producir manitol por acción de la enzima manitol 2-deshidrogenasa (MDH). En esta Tesis doctoral se utilizó la cepa *L. reuteri* CRL 1101 para la optimización de la producción de manitol. Se evaluó: tipo y concentración de la fuente de carbono (fructosa, glucosa/fructosa y melaza de caña de azúcar; 3,0-10,0%, p/v), temperatura (30 y 37 °C) y tiempo de fermentación (hasta 72 h), efecto de la agitación de los cultivos (100 rpm), y fase de crecimiento del microorganismo (lag, logarítmica y estacionaria). La melaza de caña de azúcar —subproducto de la industria azucarera local— resultó un sustrato adecuado para la producción de manitol por *L. reuteri* CRL 1101. Se formuló un medio de cultivo minimizado (MLC) conteniendo melaza, extracto de levadura y extracto de carne evaluándose posteriormente el efecto de la biomasa inicial y del pH del cultivo en este medio. Esta cepa produjo 228 ± 6 mM (42 ± 1 g/L) de manitol en condiciones de cultivo optimizadas: medio MLC, agitación (100 rpm), inóculo= 0,001 g/L, pH 5,0, 37 °C y 24 h de incubación. Esta es la máxima producción de manitol informada a la fecha usando una cepa salvaje de *L. reuteri*. También, se realizaron estudios moleculares sobre la producción de manitol usando un medio químicamente definido bajo condiciones de producción de manitol (presencia de fructosa) vs no producción (ausencia de fructosa). Se evaluó actividad MDH, la expresión del gen *mdh* —que codifica para esa enzima— mediante qPCR y la expresión diferencial de proteínas intracelulares mediante estudios proteómicos. La enzima MDH mostró niveles basales de actividad ($\sim 0,5$ U/mg prot) en ausencia de fructosa. Esta actividad fue

fuertemente inducida por fructosa a las 8 h de incubación, observándose un incremento de 6 veces ($3,0 \pm 0,2$ U/mg prot) respecto al control. El gen *mdh* se expresa de manera constitutiva en ausencia de fructosa aunque la presencia de este azúcar regula positivamente su expresión aumentando 42 veces en fase logarítmica. La correlación entre la expresión del gen *mdh* y la actividad MDH encontrada sugiere que la regulación de la expresión génica ocurre a nivel transcripcional. Durante la fase logarítmica, en ambas condiciones se expresan enzimas que participan en el metabolismo de azúcares, transcripción, traducción y metabolismo de nucleótidos. En condiciones de producción de manitol se sobre-expresan proteínas que participan del catabolismo de azúcares por la vía EMP, demostrando que *L. reuteri* CRL 1101 posee los genes para metabolizar azúcares por ambas vías.

ABREVIATURAS, SIGLAS Y SÍMBOLOS

| | |
|--------------------|--|
| μA | Microamperes |
| μg | Microgramo/s |
| μL | Microlitro/s |
| μm | Micrómetro/s |
| μM | Micromolar |
| μ_{max} | Velocidad específica de crecimiento máxima |
| $^{\circ}\text{C}$ | Grados centígrados |
| 2DE | Electroforesis bidimensional |
| <i>A.</i> | <i>Aspegillus</i> |
| ADI | Vía adenina-deiminasa |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ADNc | ADN complementario |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| atm | Atmósfera/s |
| ATP | Adenosina trifosfato |
| <i>B.</i> | <i>Bacillus</i> |
| BL | Bacterias lácticas |
| <i>C.</i> | <i>Candida</i> |
| c. s. p. | Cantidad suficiente para |
| CAA | Código Alimentario Argentino |
| CDM | Medio químicamente definido, del inglés <i>Chemically Defined Medium</i> |
| CDM _G | CDM conteniendo 7% de glucosa (p/v) |
| CDM _{GF} | CDM conteniendo 2% de glucosa y 5% de fructosa (p/v) |
| cm | Centímetro/s |
| dNTPs | Desoxinucleósidos |
| DO | Densidad óptica |
| DTT | Ditiotreitol |
| <i>E.</i> | <i>Escherichia</i> |
| EMP | Vía Embden-Meyerhof-Parnas |
| <i>F.</i> | <i>Fructobacillus</i> |
| FAOSTAT | Dirección de Estadística de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura |
| FDH | Formiato deshidrogenasa |
| g | Gramo/s |
| GAP | Gliceraldehído 3P |
| GDH | Glucosa deshidrogenasa |
| h | Hora/s |
| HPLC | Cromatografía Líquida de Alta Resolución, del inglés <i>High Performance Liquid Chromatography</i> |
| ITC | Isotiocianatos |
| kDa | Kilodalton |
| L | Litro/s |
| <i>L.</i> | <i>Lactobacillus</i> |
| <i>Lc.</i> | <i>Lactococcus</i> |

| | |
|------------------|---|
| LDH | Lactato deshidrogenasa |
| <i>Leuc.</i> | <i>Leuconostoc</i> |
| M | Molar |
| MDH | Manitol 2-deshidrogenasa |
| mg | Miligramo/s |
| min | Minuto/s |
| mL | Mililitro/s |
| mM | Milimolar |
| mmol | Milimol/es |
| Mpb | Megapares de bases |
| MPD | Manitol 1-P deshidrogenasa |
| N | Normal |
| <i>N.</i> | <i>Neosartorya</i> |
| NADH | Nicotinamida adenina dinucleótido reducido |
| NADPH | Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido |
| ng | Nanogramo/s |
| nM | Nanomolar |
| <i>O.</i> | <i>Oenococcus</i> |
| P | Presión |
| <i>P.</i> | <i>Penicillium</i> |
| PAGE | Electroforesis en geles de poliacrilamida, del inglés <i>Polyacrilamide Gel Electrophoresis</i> |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa, del inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i> |
| pI | Punto isoeléctrico |
| PK | Vía 6-fosfogluconato-fosfocetolasa |
| PM | Peso molecular |
| <i>Pseu.</i> | <i>Pseudomonas</i> |
| Q _{Mtl} | Productividad volumétrica de manitol |
| qPCR | PCR cuantitativa |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| RT-qPCR | Transcripción reversa acoplada a qPCR |
| <i>S.</i> | <i>Saccharomyces</i> |
| SD | Desviación estándar |
| SDS | Dodecilsulfato de sodio |
| <i>Strep.</i> | <i>Streptococcus</i> |
| <i>T.</i> | <i>Torulopsis</i> |
| TCA | Ácido tricloroacético |
| T _m | Temperatura de fusión o temperatura de <i>melting</i> |
| U | Unidad/es enzimática/s |
| <i>U.</i> | <i>Uromyces</i> |
| UFC | Unidades formadoras de colonias |
| V | Voltio/s |
| Vh | Voltios hora |
| vol | Volumen/es |
| Y _{Mtl} | Rendimiento de manitol |
| <i>Z.</i> | <i>Zymomonas</i> |

INTRODUCCIÓN

La ciencia es una de las formas más elevadas del quehacer espiritual pues está ligada a la actividad creadora del intelecto, forma suprema de nuestra condición humana.

René Gerónimo Favaloro (1923 - 2000)

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. POLIOLES

Los polioles son una clase de carbohidratos cuya característica distintiva es el reemplazo de un grupo carbonilo ($>C=O$) por un grupo alcohol ($>CH-OH$) en mono-, di-, oligo- y polisacáridos. Los polioles son también conocidos como azúcares alcoholes, polialcoholes o hidratos de carbono hidrogenados. Por lo general, llevan el sufijo "-itol" en reemplazo del sufijo "-osa" de la molécula de carbohidrato precursora (McNaught, 1996). La denominación "poliol" es una sinopsis de "polialcohol" o "alcohol polihídrico", del inglés "*polyhydric alcohol*" (Livesey, 2003). Los polioles se clasifican en dos grupos según la disposición de la cadena carbonada: los polioles alifáticos y los polioles cíclicos, denominados **ciclitoles** o **inositoles** (Plouvier, 1963). Los polioles alifáticos a menudo son llamados **alditoles** (polioles de aldosas), aunque también encontramos en este grupo a los polioles alifáticos de disacáridos, como el maltitol y lactitol (Figura 1.1), derivados de la maltosa y lactosa, respectivamente. A continuación se describirá con más detalle el grupo de los alditoles debido a que este trabajo de Tesis se focaliza en el estudio del manitol, uno de los alditoles más ampliamente distribuidos en la naturaleza.

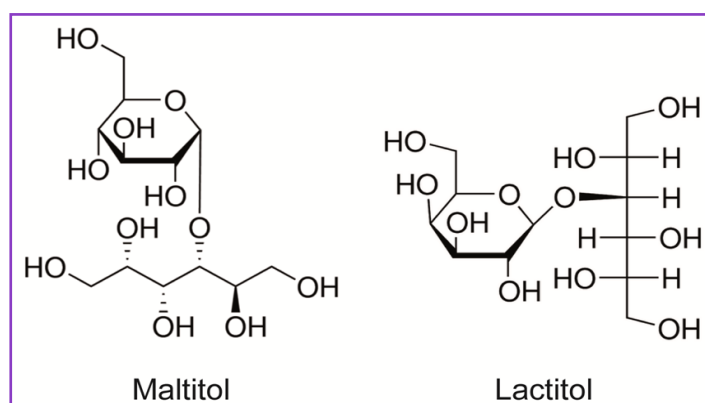


Figura 1.1 Estructuras químicas del maltitol y lactitol.

1.1.1. Los alditoles

De acuerdo al número de grupos hidroxilo presentes en la molécula, los alditoles pueden clasificarse en **tetritoles**, como el eritritol; **pentitoles**, como el xilitol; y **hexitoles**, como manitol y sorbitol; presentando en algunos casos estereoisómeros (Lawson, 1997). Cuando se hidrogena —o reduce— la fructosa, por ejemplo, se forman manitol y sorbitol, que difieren solamente en la posición del grupo hidroxilo recientemente formado; el sorbitol también puede formarse a partir de la glucosa. En la Figura 1.2 se muestran las estructuras químicas del manitol, sorbitol, xilitol y eritritol, los polioles más utilizados en las industrias alimentaria y farmacéutica.

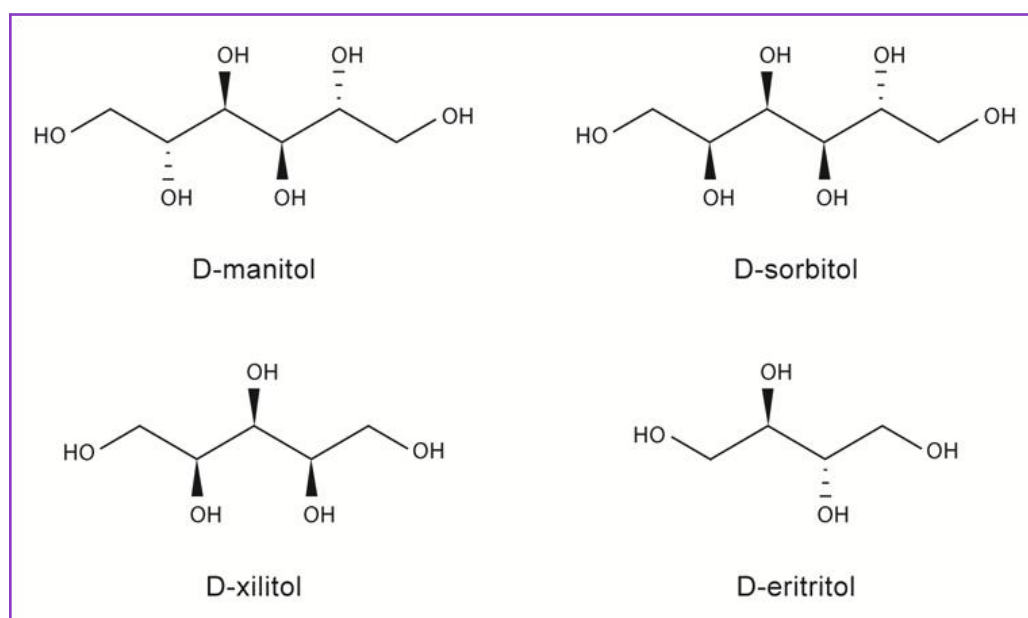


Figura 1.2 Estructuras químicas de D-manitol, D-sorbitol, D-xilitol y D-eritritol.

1.1.1.a. Propiedades físico-químicas

En general, los polioles son compuestos cristalinos, solubles en agua y de sabor dulce. Las propiedades físico-químicas de algunos alditoles se detallan en la Tabla 1.1. En solución acuosa, los grupos hidroxilo del polirol se hidratan e influyen en la estructura del agua, la compresibilidad de la solución, la presión de vapor y la constante dieléctrica, entre otros. El carácter débilmente ácido de los alditoles aumenta con el número de grupos alcohol, como se indica por los valores de pKa en solución acuosa a 18 °C (Lawson, 1997) (Tabla 1.1). Por estas características físico-químicas, los polioles son

capaces de actuar como agentes de textura, suavizantes, humectantes y estabilizadores del color. Debido a que no poseen grupos aldehído ni ceto, los polioles no participan en la reacción de Maillard. Esta reacción tiene lugar durante el calentamiento de los alimentos y consiste en la glicosilación no enzimática de proteínas con la participación de azúcares y aminoácidos (Monedero y col., 2010; Ghosh y Sudha, 2012). Dado que los polioles no intervienen en esta reacción, se mantienen intactos hasta el final del proceso de cocción. Las propiedades físico-químicas del manitol se describen con mayor detalle en el apartado 1.2.2.

Tabla 1.1 Características físico-químicas de algunos polioles.

| Poliol | Peso molecular ¹ (g/mol) | Punto de fusión ¹ (°C) | Solubilidad a 25 °C ² (g/100 g H ₂ O) | Entalpía de disolución ² (kJ/kg) | pKa en solución acuosa a 18 °C ² |
|------------------|--|--------------------------------------|--|--|---|
| Eritritol | 122,12 | 118-120 | 61,5 | -23,3 | 13,90 |
| Ribitol | 152,15 | 102-104 | --- | --- | --- |
| Xilitol | 152,15 | 93-94,5 | 179 | 153,1 | 13,79 |
| Sorbitol | 182,17 | 93-112 | 235 | 111,5 | 13,57 |
| Manitol | 182,17 | 165-168 | 22 | 120,9 | 13,50 |

¹Ghosh y Sudha, 2012; ²Lawson, 1997

1.1.1.b. Características generales

En la industria alimentaria, los polioles se usan como sustitutos de la sacarosa debido a su sabor dulce. Su destino final en el organismo depende de su digestión y metabolismo. Los polioles como el sorbitol, manitol y xilitol son absorbidos en el intestino delgado a través de un mecanismo de difusión pasiva, a diferencia de la glucosa que se absorbe rápidamente a través de un transporte activo. La fracción de polioles que se absorbe puede ser metabolizada parcialmente y el resto excretarse en orina o bien puede metabolizarse por completo (Schiweck y col., 2012). La fracción de polioles que alcanza el colon puede ser degradada por ciertas bacterias, conduciendo a la producción de ácidos grasos de cadena corta como propionato y butirato, compuestos considerados beneficiosos para la salud del hospedador (van Munster y Nagengast, 1993; Liong y Shah, 2005). En la Tabla 1.2 se muestra la versatilidad de los polioles respecto a su capacidad para ser absorbidos, fermentados a nivel de colon y/o excretados en orina.

Por otro lado, el consumo excesivo de polioles puede resultar en la aparición de efectos gastrointestinales adversos similares a los asociados con la ingesta de alimentos que contienen hidratos de carbono de baja digestibilidad como algunas verduras, frutos secos o cereales de salvado. La ingesta diaria máxima recomendada no debe superar los 20 g para el manitol y 50 g para sorbitol y maltitol. La sensibilidad a estos efectos secundarios depende del umbral de tolerancia de cada individuo, el cual puede aumentar mediante el incremento progresivo del consumo de polioles (Kroger y col., 2006; Schiweck y col., 2012).

En términos generales se definen como **carbohidratos glucémicos** a aquellos que proporcionan glucosa para el metabolismo mientras que los **carbohidratos no glucémicos** son aquellos que llegan al intestino grueso antes de ser metabolizados (Cummings y Stephen, 2007). Teniendo en cuenta esta definición, los polioles se consideran carbohidratos no glucémicos, por lo tanto tienen un escaso o nulo impacto sobre los niveles de glucosa en sangre (glucemia) y, por esta propiedad, son aplicables en la manufactura de productos alimenticios aptos para diabéticos.

Gracias a su absorción parcial en el intestino, los polioles también exhiben valores calóricos reducidos en comparación con azúcares comunes. La sacarosa proporciona 4 kcal/g mientras que los polioles aportan valores energéticos menores, siendo el eritritol y el manitol los de menor contribución (Tabla 1.2) (McNutt, 2000). Por esta propiedad son ideales para incorporarlos en productos de bajas calorías.

Tabla 1.2 Valores aproximados del aporte calórico, absorción, fermentación y excreción por orina de algunos polioles.

| Poliol | Aporte calórico ¹ (kcal/g) | Absorción en intestino ² (g/100 g) | Fermentación en colon ² (g/100 g) | Excreción por orina ² (g/100 g) |
|------------------|---------------------------------------|---|--|--|
| Eritritol | 0,2 | 90 | 10 | 90 |
| Xilitol | 2,4 | 50 | 50 | <2 |
| Sorbitol | 2,6 | 25 | 75 | <2 |
| Manitol | 1,6 | 25 | 75 | 25 |
| Lactitol | 2,0 | 2 | 98 | <2 |
| Maltitol | 2,1 | 40 | 60 | <2 |

¹ McNutt, 2000; ² Livesey, 2003.

1.1.1.c. Alditoles de interés industrial

El **manitol** es un hexitol derivado de la fructosa ampliamente distribuido en la naturaleza. Se encuentra en frutas y vegetales y es producido naturalmente por ciertas plantas, algas, hongos filamentosos de los géneros *Aspergillus (A.)* y *Penicillium (P.)*, levaduras del género *Candida (C.)* y bacterias como *Pseudomonas (Pseu.) putida* y principalmente por algunas bacterias lácticas (BL), donde el manitol es un producto natural del metabolismo (Kets y col., 1996; Song y Vieille, 2009; Monedero y col., 2010). En la producción de alimentos, el manitol se emplea principalmente como edulcorante y como azúcar no metabolizable de bajas calorías (referido como E421 en la Unión Europea) siendo aplicable en productos alimenticios para diabéticos (Salminen y Hallikainen, 2002; Livesey, 2003). Se utiliza también como ingrediente alimenticio para producir sensación de frescura en la boca al entrar en contacto con la saliva debido a que su **entalpía de disolución** es positiva (120,9 kJ/kg; Lawson, 1997), es decir que el proceso es endotérmico y absorbe calor del medio circundante (Brown y col., 1998). Algunos autores utilizan el término **calor de disolución** en lugar de entalpía de disolución, pero invirtiendo el signo con respecto al de la entalpía, lo que causa cierta confusión (Wohlfarth, 2006). En este trabajo de Tesis se informan los valores de entalpías de disolución (signo positivo para las reacciones endotérmicas). Además, el manitol se usa como un agente texturizante y antiaglutinante (Salminen y col., 1998). En

medicina este poliol se utiliza como diurético osmótico, y en la industria farmacéutica se emplea para la formulación de medicamentos gracias a su baja higroscopicidad y a su capacidad para enmascarar sabores indeseables de muchos compuestos (Debord y col., 1987). Además, ha sido apreciado por sus efectos antioxidante y no cariogénico, ya que es escasamente metabolizado por los microorganismos orales (Wennerholm y col, 1991; Shen y col., 1997).

La producción industrial de manitol se lleva a cabo por síntesis química mediante hidrogenación de la fructosa a altas temperaturas y presiones. Este proceso no es muy eficiente y requiere sustratos de alta pureza (Song y Vieille, 2009). El isómero óptico L-manitol, no se produce de forma natural pero se obtiene, por ejemplo, por reducción de L-manosa (Benson, 1978). Dado que esta Tesis se focaliza en la producción de la forma D, el uso del término "manitol" se referirá exclusivamente al D-manitol. En el apartado 1.2 se ampliará sobre las propiedades y aplicaciones de este compuesto.

El **sorbitol**, también conocido como D-glucitol, es un hexitol no cíclico derivado de la D-glucosa que se encuentra naturalmente en varias frutas como uvas, ciruelas, frutos rojos, peras y manzanas, así como en algunos vegetales (Budavari y col., 1996; Gutiérrez y Gaudillere, 1996). El sorbitol, cuya dulzura relativa a la sacarosa es de alrededor del 60%, se usa como edulcorante, humectante, texturizador y suavizante en la industria alimentaria. Se utiliza también en la fabricación de chicles, dulces, postres, helados y alimentos para diabéticos. Además, el sorbitol es el material de partida para la producción de ácido ascórbico y otros compuestos de interés farmacéutico (Ladero y col., 2007). Varias levaduras y bacterias tales como *C. boidinii* y *Zymomonas (Z.) mobilis*, respectivamente, sintetizan naturalmente sorbitol mientras que las BL no lo hacen aunque sí son capaces de metabolizarlo (Tani y Vongsuvanlert, 1987; Silveira y col., 1999; Erzinger y Vitolo, 2006).

El **xilitol** es un azúcar alcohol de cinco carbonos derivado de la D-xilosa. Se encuentra de forma natural en muchas frutas y verduras, pudiendo ser extraído de frutos rojos, avena y champiñones. Las levaduras son los microorganismos que producen xilitol más eficientemente, siendo las mejores productoras aquellas pertenecientes al género *Candida* (Parajó y col., 1998). Desafortunadamente estos microorganismos no pueden

ser aplicados en la industria alimentaria debido a la condición patógena de muchas de sus especies. De la misma manera que el manitol, el xilitol es conocido por sus propiedades anticariogénicas y por provocar una sensación de frescura en contacto con la saliva debido a que su entalpía de disolución es positiva (153,1 kJ/kg; Lawson, 1997), por lo tanto, se utiliza en productos dentales y en chicles. Además, su consumo regular en dosis adecuadas reduce el riesgo de desarrollar caries (Söderling y col., 2011). Los efectos beneficiosos más importantes del xilitol en la salud bucal son la inhibición del crecimiento y el metabolismo de *Streptococcus (Strep.) mutans* (principal agente causal de caries) y *Strep. sobrinus* (responsable de la producción de ácido de la placa dental), con el consiguiente aumento del pH en la cavidad oral y su contribución a la remineralización de los dientes (Tanzer, 1995; Bahador y col., 2012). También se ha demostrado que el xilitol reduce la incidencia de infecciones del oído (Nyssölä y col., 2005).

El **eritritol** es un poliol de cuatro carbonos derivado de la eritrosa que está presente de forma natural en algunas frutas (uvas, peras, melones y sandías), champiñones, y alimentos fermentados como salsa de soja, sake, cerveza y vino, donde las levaduras son los microorganismos asociados al proceso fermentativo (Bernt y col., 1996; Embuscado y Patil, 2001). Estudios metabólicos demostraron que a pesar de que el eritritol se absorbe casi por completo (90%) (Tabla 1.2) no se metaboliza sistémicamente y se excreta intacto en la orina pudiendo estar disponible solo en pequeñas cantidades para su fermentación en el colon. En estudios clínicos no se encontraron efectos secundarios gastrointestinales significativos usando dosis altas (hasta 1 g/kg peso corporal) (Bernt y col., 1996).

El eritritol se produce industrialmente mediante procesos de fermentación con levaduras osmofílicas (Embuscado y Patil, 2001) ya que la eritrosa es un sustrato de elevado costo para ser utilizado en hidrogenación catalítica directa (Monedero y col., 2010). La producción de eritritol también se ha observado en algunas especies de BL como *Oenococcus (O.) oeni*, *Leuconostoc (Leuc.) mesenteroides* y *Lactobacillus (L.) sanfranciscensis* (Veiga-da-Cunha y col., 1993; Stolz y col., 1995; Richter y col., 2001). La vía de formación de eritritol en BL a partir de glucosa involucra a cuatro enzimas: 1) la

fosfoglucoasa isomerasa que convierte la glucosa-6-P en fructosa-6-P, 2) la fosfoacetolasa que escinde fructosa-6-P en eritrosa-4-P y acetil-P, 3) la eritritol 4-P deshidrogenasa que reduce eritrosa-4-P en eritritol-4-P, y finalmente 4) una fosfatasa que convierte el eritritol-4-P en eritritol. A partir de acetil-P se produce acetato o etanol (Veiga-da-Cunha y col., 1993).

1.2. MANITOL

1.2.1. Fuentes naturales de manitol

El manitol es un hexitol derivado de la manosa o de la fructosa. Se encuentra distribuido ampliamente en la naturaleza y es el poliol más abundante en el reino vegetal. Se lo puede encontrar en frutas y vegetales comestibles como frutillas, calabazas, cebollas, perejil y apio; en los líquenes y en diversas plantas, principalmente en los géneros *Euonymus* y *Hebe*, en *Digitalis purpurea*, el grano de cacao y el muérdago. Se encuentra presente en cantidades significativas en los exudados de árboles y arbustos, tales como el plátano (80-90%), el fresno del maná (30-50%) y el olivo. El manitol es el principal constituyente de la savia del fresno del maná (*Fraxinus ornus*). Por calentamiento de la corteza de este árbol se obtiene un extracto de la savia denominado "maná", el cual puede contener hasta un 50% de manitol (Lawson, 1997). Este extracto fue comparado en la época medieval tardía con el maná bíblico, dando lugar al nombre popular del árbol "fresno del maná", también conocido como fresno de flor o fresno florido. En el año 1802, Proust logró aislar por primera vez manitol en estado cristalino a partir del maná (Proust, 1802). El manitol también se encuentra naturalmente en algunos hongos comestibles como champiñones frescos (1%) y en las algas marinas pardas (*Laminaria*), con variaciones estacionales en el contenido de manitol que puede llegar a superar el 20% en verano y otoño. Además, un gran número de hongos y bacterias puede producir este poliol a partir de glucosa, fructosa o sacarosa (Lawson, 1997; Schiweck y col., 2012). En el apartado 1.4 abordaremos con mayor detalle la producción microbiana de manitol.

1.2.2. Propiedades generales y aplicaciones

El manitol cristaliza en forma de agujas ortorrómbicas blancas, cuya temperatura de fusión es 165-168 °C. Entre sus características fisicoquímicas, se pueden destacar su escasa reactividad química y su baja higroscopicidad, siendo la absorción de agua menor al 1% a 25 °C y a una humedad relativa del 92%. Por esto, el manitol no contribuye a la absorción de humedad del ambiente (Burger y col., 2000). Estas propiedades, junto a su sabor dulce, hacen del manitol un compuesto con diversas aplicaciones en medicina y en las industrias alimenticia, farmacéutica y química.

1.2.2.a. Industria de los alimentos

El manitol ha sido clasificado como un compuesto **GRAS** (del inglés, *Generally Recognized as Safe*) por la Administración de Fármacos y Alimentos de Estados Unidos (FDA, del inglés *Food and Drug Administration*) (Salminen y Hallikainen, 2002) y como **aditivo alimentario** (E421) por la Unión Europea, por lo que se considera seguro para su uso en alimentos (Vrancken y col., 2010). Debido a su sabor dulce (60% en relación a la sacarosa) el manitol se emplea en la industria alimentaria principalmente como edulcorante, especialmente en productos para pacientes diabéticos (Livesey, 2003). Debido a sus propiedades no cariogénicas y a su capacidad para impartir una sensación refrescante cuando se disuelve en la boca (entalpía de disolución positiva, 120,9 kJ/kg), se lo emplea para espolvorear la superficie de los chicles en lámina llamados "sin azúcar" y en la elaboración de otros productos de características similares (Lawson, 1997). Por otro lado, el agregado de manitol puede mejorar la calidad de los caramelos duros a base de sorbitol o maltitol. Gracias a su baja higroscopicidad, el manitol se añade a los postres instantáneos en polvo para reducir la absorción de humedad y aumentar la fluidez (Schiweck, 2012).

1.2.2.b. Industria farmacéutica

Una de las principales aplicaciones del manitol se encuentra en la industria farmacéutica. Debido a su baja reactividad química y sus excelentes propiedades mecánicas de compresión, el manitol se usa desde hace décadas en la producción de

comprimidos, tabletas masticables, polvos, granulados y otras formulaciones farmacéuticas (Debord y col., 1987). Además, por su sabor dulce y fresco se utiliza para enmascarar sabores desagradables de muchos fármacos como la aspirina (Schiweck y col., 2012). Las formulaciones que contienen manitol retienen poca humedad debido a su baja higroscopicidad, por lo que es un excelente excipiente y por lo tanto adecuado para su uso con principios activos sensibles a la humedad (Lawson, 1997).

1.2.2.c. Industria química

En la industria química el manitol se utiliza en la fabricación de resinas artificiales y plastificantes. El complejo de ácido bórico con manitol se utiliza en la producción de condensadores electrolíticos secos. Por otro lado, el hexanitrateo de manitol se utiliza como un iniciador en detonadores en la industria de los explosivos (Lawson, 1997; Soetaert y col., 1999).

1.2.2.d. Medicina

El manitol es uno de los principales diuréticos osmóticos utilizados en medicina. En general, se utilizan soluciones de manitol al 10 y 20% (p/v), cuyo nombre comercial es *Osmitrol*. Los diuréticos osmóticos se definen como sustancias de bajo peso molecular, osmóticamente activas y farmacológicamente inertes, que son filtradas en el riñón pero no reabsorbidos o solo en forma parcial (Flórez y Armijo, 1992). Debido a su gran tamaño, las moléculas de manitol se mantienen en el espacio vascular del cuerpo lo que crea un gradiente osmótico, que resulta en el movimiento de agua desde los tejidos hacia los sistemas intravasculares. El manitol se utiliza para aumentar la producción de orina con el fin de prevenir o tratar la insuficiencia renal aguda, para el tratamiento del edema cerebral progresivo (Lorimer y col., 1989) y para reducir la presión intraocular (Hase y Reulen, 1980; Rhee y col., 2006).

1.2.2.e. Otros usos

El manitol se emplea como componente de medios de cultivos bacteriológicos, generalmente para el aislamiento, detección, identificación y/o crecimiento del

patógeno *Staphylococcus aureus* (Blair y col., 1967; Lally y col., 1985; Kampf y col., 1998; De Visscher y col., 2013). También se utiliza como conservante durante el almacenamiento de glóbulos rojos evitando la lisis celular (Hess y Greenwalt, 2002; Sparrow, 2012) y para la conservación de cultivos bacterianos liofilizados durante el período de almacenamiento (Dianawati y col., 2012).

1.2.3. Legislación Argentina sobre el uso del manitol en alimentos

El **Código Alimentario Argentino (CCA)** puesto en vigencia por la Ley N° 18.284 y reglamentado por el Decreto N° 2126/71 (sitio *web* de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica, ANMAT), en el "Capítulo XVII: Alimentos de Régimen o Dietéticos" (actualización 03/2013) establece que "[...] pueden utilizarse los siguientes edulcorantes nutritivos: sorbitol, xilitol y jarabe de maltitol, quedando regulado su empleo por las buenas prácticas de manufactura. Puede utilizarse **manitol** con las siguientes limitaciones:

- *golosinas y caramelos duros hasta 5%*
- *chicles hasta 40%*
- *golosinas blandas, caramelos en barra y chocolate hasta 30%*
- *pastillas, confites y chocolates para horno hasta 8%*
- *mermeladas y jaleas hasta 15%*
- *todo otro alimento hasta 2,5%*

Asimismo, el manitol forma parte de la *Lista General Armonizada de Aditivos Alimentarios y sus Clases Funcionales* del CCA, bajo el código 421, donde se le asignan las siguientes funciones: edulcorante, estabilizante, antihumectante, antiaglutinante, agente de masa, emulsionante y espesante (CCA, "Capítulo XVIII: Aditivos Alimentarios", actualización 01/2014).

1.3. PROCESOS DE PRODUCCIÓN DE MANITOL

1.3.1. Producción química

Actualmente la síntesis industrial de manitol se realiza a partir de la hidrogenación catalítica de jarabes de glucosa-fructosa, como el jarabe de maíz con alto contenido en fructosa conocido como HFCS (del inglés *high fructose corn syrup*) (Schiweck y col., 2012). El proceso de hidrogenación se realiza a altas temperaturas (100-130 °C) y presiones (200-800 psi), utilizando un catalizador de níquel Raney y gas hidrógeno (Wisniak y Simon, 1979). Durante este proceso las moléculas de β -fructosa se transforman en manitol, mientras que las moléculas de α -fructosa se convierten en sorbitol, isómero del manitol. Por otra parte, la glucosa es completamente convertida en sorbitol. De esta manera, se obtiene como producto final una mezcla de 25-30% de manitol y 75-70% de sorbitol, lo que obliga a aplicar procesos posteriores de purificación (Wisniak y Simon, 1979; Soetaert y col., 1999). La producción de manitol por hidrogenación química en un solo paso está siempre asociada a la producción simultánea de sorbitol, que se considera un producto secundario del proceso. El aislamiento de manitol a partir de una mezcla de manitol y sorbitol se basa en las diferentes solubilidades de estos compuestos, ya que el manitol tiene menor solubilidad que el sorbitol (Schiweck y col., 2012). Las etapas de purificación generalmente comprenden concentración, cristalización en frío, separación del cristal y secado.

Por lo expuesto, este proceso presenta dos grandes desventajas: i) es económicamente costoso debido a las fuertes condiciones de presión y temperatura utilizadas, así como a la necesidad de emplear sustratos de partida extremadamente puros; ii) está asociado a un bajo rendimiento de manitol y escasa pureza del producto final debido a la baja selectividad del catalizador utilizado. Estas desventajas contribuyen a aumentar el costo global asociado al proceso.

1.3.2. Producción enzimática

El manitol también puede producirse enzimáticamente mediante la reducción de fructosa a manitol por acción de la enzima manitol 2-deshidrogenasa (MDH) (Figura 1.3). Esta enzima requiere un cofactor que puede ser NADH o NADPH.

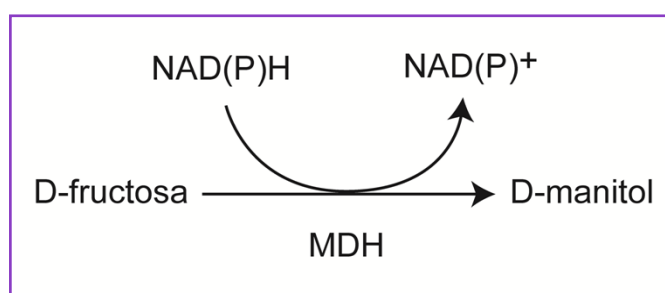


Figura 1.3 Reacción catalizada por la enzima manitol 2-deshidrogenasa (MDH).

La enzima MDH dependiente de NADH (EC 1.1.1.67) se aisló por primera vez de *L. brevis* (Martinez y col., 1963). Más tarde se purificó a partir de *Leuc. mesenteroides* (Sakai y Yamanaka, 1968; Hahn y col., 2003), de la levadura *Torulaspora delbrueckii* (Nidetzky y col., 1996), de otras bacterias como *Rhodobacter sphaeroides* (Schneider y Giffhorn, 1989) y *Pseu. fluorescens* (Brünker y col., 1997), y a partir del alga roja *Caloglossa leprieurii* (Karsten y col., 1997). También se aisló y purificó la MDH dependiente de NADPH (EC 1.1.1.138) a partir de hongos filamentosos como *A. parasiticus* (Niehaus y Dilts, 1982) y bacterias como *Z. mobilis* (Viikari y Korhola, 1986) y *Gluconobacter suboxydans* (Adachi y col., 1999). Más recientemente, esta enzima fue aislada a partir de diversas BL, entre ellas *L. sanfranciscensis* (Korakli y Vogel, 2003), *L. intermedius* (Saha, 2004) y *L. reuteri* (Sasaki y col., 2005).

La dependencia del cofactor por parte de la enzima es una de las principales limitaciones en un proceso de transformación enzimática. En el caso de la enzima MDH, los cofactores NADH y NADPH son muy costosos, lo que hace que el proceso enzimático sea prácticamente inviable a nivel industrial. Una estrategia común para sortear este inconveniente es la regeneración del cofactor aplicando un sistema de dos enzimas con la conversión simultánea de dos sustratos en dos productos de interés industrial y la consiguiente regeneración del cofactor. Un ejemplo de ello es la conversión simultánea

de fructosa y formiato usando las enzimas MDH y formiato deshidrogenasa (FDH) (Wichmann y col., 1981; Parmentier y col., 2005). Tal como se muestra en la Figura 1.4, la FDH convierte el formiato a CO_2 y reduce NAD(P)^+ a NAD(P)H , mientras que la MDH utiliza NAD(P)H para convertir la fructosa en manitol y regenerar NAD(P)^+ . El formiato es un sustrato económico y el CO_2 formado se separa fácilmente de la mezcla de reacción. En un proceso utilizando una MDH recombinante de *Pseu. fluorescens* sobreexpresada en *Escherichia (E.) coli* y una FDH de *C. boidinii* se logró una productividad volumétrica de manitol de 2,25 g/L h, con una concentración de producto final de 72 g/L y un rendimiento del 80% (Slatner y col., 1998).

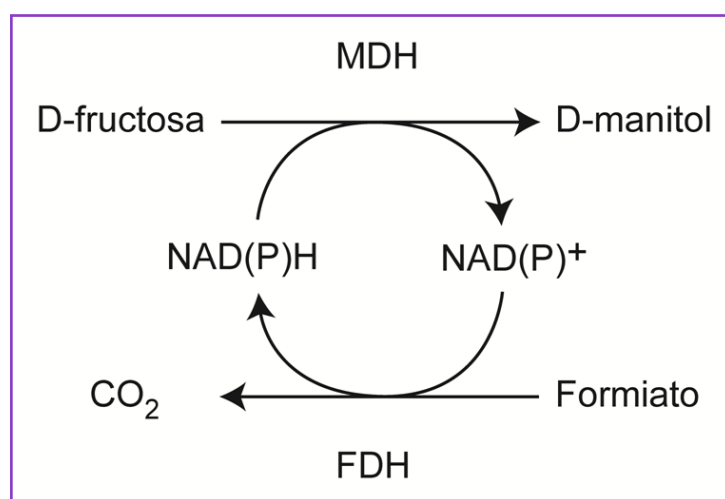


Figura 1.4 Regeneración del cofactor NAD(P)H usando manitol 2-deshidrogenasa (MDH) y formiato deshidrogenasa (FDH).

Otro ejemplo es la combinación de una MDH con una glucosa deshidrogenasa (GDH) utilizando como sustrato de partida una mezcla de glucosa y fructosa (1:1). Esto permite la síntesis simultánea de manitol y ácido glucónico (Kulbe y col., 1987; Nidetzky y col., 1996), tal como se muestra en la Figura 1.5. La GDH dependiente de NAD(P)^+ convierte la glucosa en ácido glucónico y genera NAD(P)H mientras que la MDH utiliza NAD(P)H para reducir la fructosa a manitol y de esta forma se regenera NAD(P)^+ . El ácido glucónico tiene múltiples aplicaciones en la industria química, farmacéutica, textil, de alimentos y bebidas. También se utiliza en la industria de la construcción como un aditivo para aumentar la resistencia y la estabilidad del cemento (Kulbe y col., 1987; Hustede y col., 1989).

Baumchen y col. (2007) desarrollaron un sistema *in vivo* para la conversión de fructosa a manitol mediante la expresión heteróloga del gen *mdh* que codifica para la MDH de *Leuc. pseudomesenteroides* en *Bacillus (B.) megaterium*. La regeneración del cofactor se obtuvo a través de la oxidación de formiato a CO₂ mediante la co-expresión de gen *fdh* que codifica para la FDH N10 de *Mycobacterium vaccae*. La cepa recombinante de *B. megaterium* produjo 22 g/L de manitol en un biorreactor de lote alimentado, con una productividad específica de 0,32 g/g biomasa h y un rendimiento de manitol de 0,91 mol/mol. Sin embargo, la captación de sustrato fue el factor limitante global del proceso de transformación.

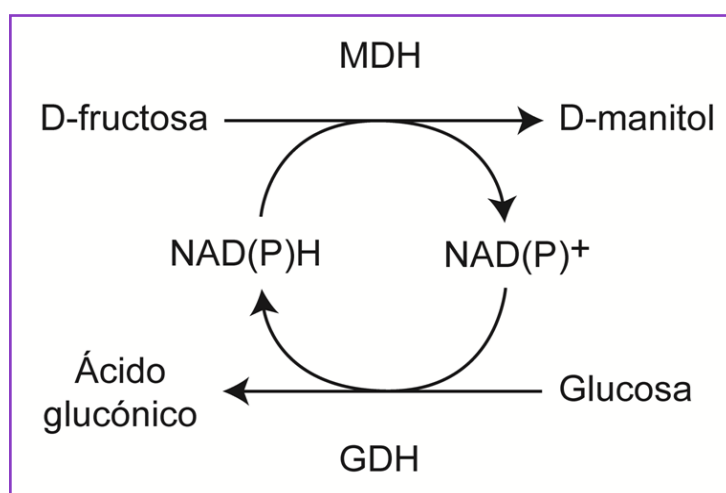


Figura 1.5 Regeneración del cofactor NAD(P)H usando manitol 2-deshidrogenasa (MDH) y glucosa deshidrogenasa (GDH).

En la práctica, aún quedan por resolver varios inconvenientes relacionados a estos procesos de hidrogenación enzimática como la retención del cofactor en el reactor y la fuerte inhibición de la enzima por formación del producto (Soetaert y col., 1999).

1.3.3. Producción microbiana

Con el fin de mejorar el rendimiento total del proceso de producción de manitol, evitando las dificultades que presentan tanto la síntesis enzimática como la hidrogenación química, sería interesante desarrollar un proceso donde el manitol sea el producto principal y se evite la formación de sorbitol. Los costos asociados con los preparados de enzimas y la regeneración de cofactor para la síntesis *in vitro* de manitol, contribuyen a la percepción general de que el uso de microorganismos como células

enteras representa un enfoque biológico más atractivo para la producción de este compuesto a partir de materias primas ricas en azúcar.

Las levaduras, los hongos filamentosos y las bacterias son eficaces productores de manitol sin la formación simultánea de sorbitol (Song y Vieille, 2009; Saha y Racine, 2011). Estos microorganismos presentan la ventaja de producir cofactores como resultado del catabolismo de los carbohidratos, es decir que tienen incorporada la maquinaria necesaria para el suministro de cofactores, por lo que no es necesario añadirlos al medio de reacción. En el apartado 1.4 se hará una revisión detallada sobre la producción de manitol por microorganismos de tipo salvaje (*wild type*). Entre los microorganismos estudiados, las BL parecen ser las productoras de manitol con mayor potencial (Wisselink y col., 2002; Monedero y col., 2010). Por otro lado, se desarrollaron procesos para mejorar la producción microbiana de xilitol, manitol y sorbitol mediante ingeniería metabólica (Akinterinwa y col., 2008; Monedero y col., 2010), que no serán objeto de estudio en este trabajo de Tesis.

1.4. PRODUCCIÓN DE MANITOL POR MICROORGANISMOS

El manitol cumple diversas funciones en los microorganismos que lo producen: a) se utiliza como reserva de carbohidratos, b) tiene efecto osmoprotector: actúa como soluto compatible protegiendo a los microorganismos en condiciones de estrés osmótico, c) posee efecto antioxidante: se acumula en respuesta al estrés oxidativo mostrando capacidad para depurar las especies reactivas del oxígeno y d) participa en la regeneración del poder reductor: dado que durante el metabolismo del manitol se produce ATP y NAD(P)H se cree que la síntesis de este poliol está implicada en el control de la relación intracelular $NAD(P)^+/NAD(P)H$, generando una condición energéticamente más favorable para la célula (Wisselink y col., 2002; Song y Vieille, 2009).

1.4.1. Hongos filamentosos

Varios hongos filamentosos son capaces de producir manitol a partir de carbohidratos. *A. niger* es capaz de producir manitol utilizando acetato de sodio como única fuente de carbono (Barker y col., 1958). En la cepa *A. candidus* NRRL 305 se encontró que el 50% de la glucosa consumida se convertía en manitol después de seis días de fermentación aeróbica. En un intento para disminuir el tiempo de fermentación y contrariamente a lo esperado, se obtuvieron un rendimiento del 31 mol% y una productividad volumétrica de 0,15 g de manitol/L h debido a que las células comenzaron a utilizar el manitol producido como fuente de carbono una vez consumida el azúcar inicial (Smiley y col., 1967; 1969). Los estudios enzimáticos de la ruta metabólica presente en esta especie confirmaron que el manitol se forma a partir de la glucosa a través de los intermediarios fructosa 6-P y manitol 1-P (Strandberg, 1969).

Algunas especies del género *Penicillium* también poseen la capacidad de producir manitol como por ejemplo la cepa *P. chrysogenum* 4176 que produjo manitol a partir de fructosa con un porcentaje de conversión del 7,3% (Lawson, 1997). Por otro lado, *P. scabrosum* IBT JTER 4 produjo elevadas concentraciones de manitol (43 g/L) y glicerol (63 g/L) a partir de sacarosa con una productividad volumétrica de 0,14 g/L h (Hendriksen y col., 1988). Al igual que en *A. candidus*, *P. scabrosum* usó manitol como fuente de carbono una vez consumido el azúcar inicial.

El manitol y su metabolismo parecen tener múltiples funciones en los hongos. Se determinó en *Agaricus bisporus* que el manitol es su principal compuesto de almacenamiento de carbono. El peso seco del micelio puede contener hasta un 50% de manitol (Pfyffer y Rast, 1980; Stoop y Mooibroek, 1998). En el caso de la interacción entre el hongo *Uromyces fabae* y su planta hospedadora *Vicia faba*, este poliol podría tener al menos dos funciones: i) ser un compuesto de almacenamiento de carbono necesario para la supervivencia de las esporas fúngicas y para su germinación y ii) actuar también como un depurador de especies reactivas del oxígeno frente a condiciones de estrés oxidativo (Voegelé y col., 2005).

Por otra parte, se ha visto que el manitol cumple un rol importante en la patogenicidad de ciertos hongos que sintetizan manitol a partir del secuestro de los carbohidratos del hospedador. Dado que muchas plantas son incapaces de metabolizarlo, la síntesis de manitol a partir de las hexosas provenientes de la planta parece ser una estrategia ideal para el hongo como una manera de almacenar carbohidratos y poder reductor en una forma que no esté disponible para el hospedador (Ceccaroli y col., 2003; Dulermo y col., 2009). En *Alternaria brassicicola* se demostró la importancia del metabolismo de manitol en diferentes pasos claves a lo largo de su ciclo de vida durante la infección de su hospedador (Calmes y col., 2013).

1.4.2. Levaduras

La producción de polioles también es común entre las levaduras. Algunas especies del género *Torulopsis* (*T.*) como *T. versatilis* y *T. anomala* aisladas de salsa de soja, mostraron ser buenas productoras de manitol utilizando diversas fuentes de carbono como glucosa, fructosa, manosa, galactosa y maltosa (Onishi y Suzuki, 1968). La especie *T. mannifaciens* produce manitol exclusivamente a partir de glucosa y glicerol con un rendimiento del 31 mol% (Onishi y Suzuki, 1970).

C. lipolytica produce manitol como principal polirol aunque su productividad volumétrica es muy baja (0,16 g/L h) (Johnson, 1976). Más recientemente, se aisló la cepa *C. magnoliae* HH-01 proveniente de lodos de fermentación que produce manitol a partir de fructosa por acción de una MDH dependiente de NADPH. En fermentación en lote alimentado usando esta cepa se obtuvieron hasta 208 g/L de manitol (Song y col., 2002). La co-alimentación del cultivo con glucosa y fructosa y la adición de Ca^{2+} y Cu^{2+} favorecieron la producción de manitol, ya que el agregado de glucosa mejoró el mantenimiento celular y la regeneración de NADPH, el cobre incrementó la actividad MDH y el calcio incrementó la permeabilidad celular y la secreción de manitol (Baek y col., 2003; Lee y col., 2003; 2007). A pesar de que la productividad volumétrica del proceso mejorado es baja (1,72 g/L h), la concentración final de manitol fue de 223 g/L y se encuentra entre las más altas publicadas a la fecha. Cabe destacar que durante este proceso de lote alimentado, la biomasa disminuye significativamente luego de 100 h, en

lugar de aumentar o permanecer estable (Lee y col., 2003; 2007). Aún resta dilucidar si esta disminución de la biomasa podría afectar la sostenibilidad del proceso.

En el caso de *Saccharomyces (S.) cerevisiae*, que no produce naturalmente manitol y regenera NAD⁺ mediante la producción de glicerol bajo condiciones anaeróbicas, se han empleado estrategias de ingeniería genética para producir manitol a partir de glucosa con cepas mutantes aunque los rendimientos obtenidos fueron muy bajos (Costenoble y col., 2003).

En conclusión, aunque algunas levaduras y hongos filamentosos poseen la capacidad de producir manitol, el metabolismo de estos microorganismos presenta algunas desventajas cuando se evalúa su aplicación en un proceso productivo: i) las productividades volumétricas y los rendimientos obtenidos son demasiado bajos, ii) los microorganismos descritos son capaces de degradar manitol, lo que hace que el proceso de producción sea muy difícil de controlar, iii) la purificación del producto, sobre todo con levaduras, es bastante dificultosa debido a las elevadas concentraciones de glicerol presentes en el medio de cultivo y finalmente, iv) el uso de estos microorganismos en la industria alimentaria está muy cuestionado.

1.4.3. Bacterias

La síntesis de manitol está ampliamente distribuida en BL heterofermentativas. Hay algunos ejemplos de producción de este polirol en bacterias no lácticas, donde su principal función es actuar como osmoprotector, por lo que se sintetiza *de novo* en respuesta a estrés osmótico. En estos casos el manitol se acumula en el interior de la célula y las concentraciones producidas son muy bajas. *Pseu. putida*, por ejemplo, produce 0,26 mmol/mg células en respuesta a elevadas concentraciones de sacarosa (Kets y col., 1996), mientras que *Acinetobacter baylyi* sintetiza 1,60 mmol/mg células en presencia de elevadas concentraciones de NaCl (Sand y col., 2013).

El conocimiento de la formación de manitol por BL se remonta, según Onishi y Suzuki (1971), hacia finales de la década de 1930 con la publicación de una patente japonesa (Kitahara, 1938). Casi 50 años después, resurgió el interés por la capacidad de estas

bacterias para producir manitol a raíz de estudios con *Leuc. mesenteroides* ATCC 12291 (Vandamme y col., 1987), reclasificada en la actualidad como *Leuc. pseudomesenteroides*. Desde entonces y especialmente en los últimos 15 años se llevaron a cabo diversos estudios sobre la síntesis de este polirol por BL. A continuación se analizará el metabolismo de azúcares en BL y sus aplicaciones en la industria de los alimentos, principalmente en la industria láctea.

1.5. LAS BACTERIAS LÁCTICAS

1.5.1. Generalidades

Las BL constituyen un grupo heterogéneo de bacterias Gram-positivas, filogenéticamente relacionadas entre sí por sus características morfológicas, metabólicas y fisiológicas. Las BL son cocos o bacilos, no esporulados y aerotolerantes, con bajo contenido G+C (33-55%), que producen ácido láctico como principal o único producto final de fermentación de hidratos de carbono. De acuerdo con la clasificación taxonómica actual, las BL pertenecen al filo *Firmicutes*, clase *Bacilli* y orden *Lactobacillales*. Este grupo filogenético está compuesto por alrededor de 500 especies, pertenecientes a 6 familias: 1) ***Aerococcaceae*** con los géneros *Abiotrophia*, *Aerococcus*, *Dolosicoccus*, *Eremococcus*, *Facklamia*, *Globicatella* y *Ignavigranum*; 2) ***Carnobacteriaceae*** con los géneros *Alkalibacterium*, *Allofustis*, *Alloiococcus*, *Atopobacter*, *Atopococcus*, *Atopostipes*, *Carnobacterium*, *Desemzia*, *Dolosigranulum*, *Granulicatella*, *Isobaculum*, *Lacticigenium*, *Marinilactibacillus*, *Pisciglobus* y *Trichococcus*; 3) ***Enterococcaceae*** con los géneros *Bavariococcus*, *Catelicoccus*, *Enterococcus*, *Melissococcus*, *Pilibacter*, *Tetragenococcus* y *Vagococcus*; 4) ***Lactobacillaceae*** con los géneros *Lactobacillus* y *Pediococcus*; 5) ***Leuconostocaceae*** con los géneros *Fructobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* y *Weissella*; y 6) ***Streptococcaceae*** con los géneros *Lactococcus*, *Lactovum* y *Streptococcus* (von Wright y Axelsson, 2012; Mattarelli y col., 2014). Estos microorganismos carecen de catalasa y de citocromos, y muestran requerimientos nutricionales complejos debido a que tienen una limitada capacidad para la biosíntesis de aminoácidos, vitaminas y precursores macromoleculares. Por lo

tanto, generalmente son abundantes en ambientes ricos, incluyendo leche y productos lácteos, frutas y verduras, plantas, cereales, carne y productos cárnicos, de donde pueden adquirir los nutrientes necesarios (Mayo y col., 2010).

Las BL fermentan una amplia gama de azúcares y los transforman principalmente en ácido láctico. Debido a esta característica metabólica clave, las BL ocupan un papel central en la producción de alimentos y bebidas fermentadas desde tiempos remotos, mediante la aceleración del proceso de fermentación. En los primeros tiempos la obtención de productos fermentados se llevaba a cabo mediante fermentaciones espontáneas debido al desarrollo de la microbiota presente naturalmente en la materia prima (Leroy y De Vuyst, 2004). Desde hace algunas décadas muchas especies de BL se utilizan ampliamente como cultivos iniciadores (*starters*) o fermentos en la producción de una gran variedad de alimentos fermentados, especialmente productos lácteos, tales como yogures, quesos y leches fermentadas, así como también frutas, verduras, cereales, aceitunas, chucrut, masas ácidas, encurtidos y embutidos (Figura 1.6). Estas bacterias residen en una variedad de hábitats que van desde plantas hasta múltiples nichos de mamíferos; su capacidad para prosperar en una multitud de entornos se percibe como un signo de la diversidad metabólica (Gaspar y col., 2013).

El metabolismo de las BL permite disminuir tanto el contenido de carbohidratos presente en la materia prima que fermentan, así como también el pH debido a la rápida producción de ácidos orgánicos, principalmente ácido láctico. Este proceso de acidificación es uno de los efectos más deseables de su crecimiento ya que permite la inhibición del crecimiento de muchos microorganismos incluyendo los patógenos humanos más comunes, y prolongar así la vida útil de los productos fermentados. Estos microorganismos pueden también contribuir al sabor, textura, perfil sensorial agradable y el valor nutricional de los alimentos fermentados mediante la formación de compuestos de aroma, exopolisacáridos, proteínas, vitaminas y polioles (Leroy y De Vuyst, 2004; Hugenholtz, 2008). Además, algunas BL, las denominadas probióticas, han mostrado tener efectos beneficiosos para la salud y han sido incluidos en la elaboración de alimentos funcionales con propiedades específicas (Stanton y col., 2005). Debido a su amplio uso industrial, las BL han sido intensamente estudiadas y durante los últimos 40

años se ha recopilado una gran cantidad de información sobre su metabolismo, genética y biología molecular. Este conocimiento ha sido fundamental en la implementación exitosa de nuevas aplicaciones en la industria de los alimentos, como por ejemplo la selección de *starters* robustos con rasgos fenotípicos deseados, como mayor tolerancia al estrés, resistencia a fagos o mejores propiedades para otorgar textura y sabor (Gaspar y col., 2013).

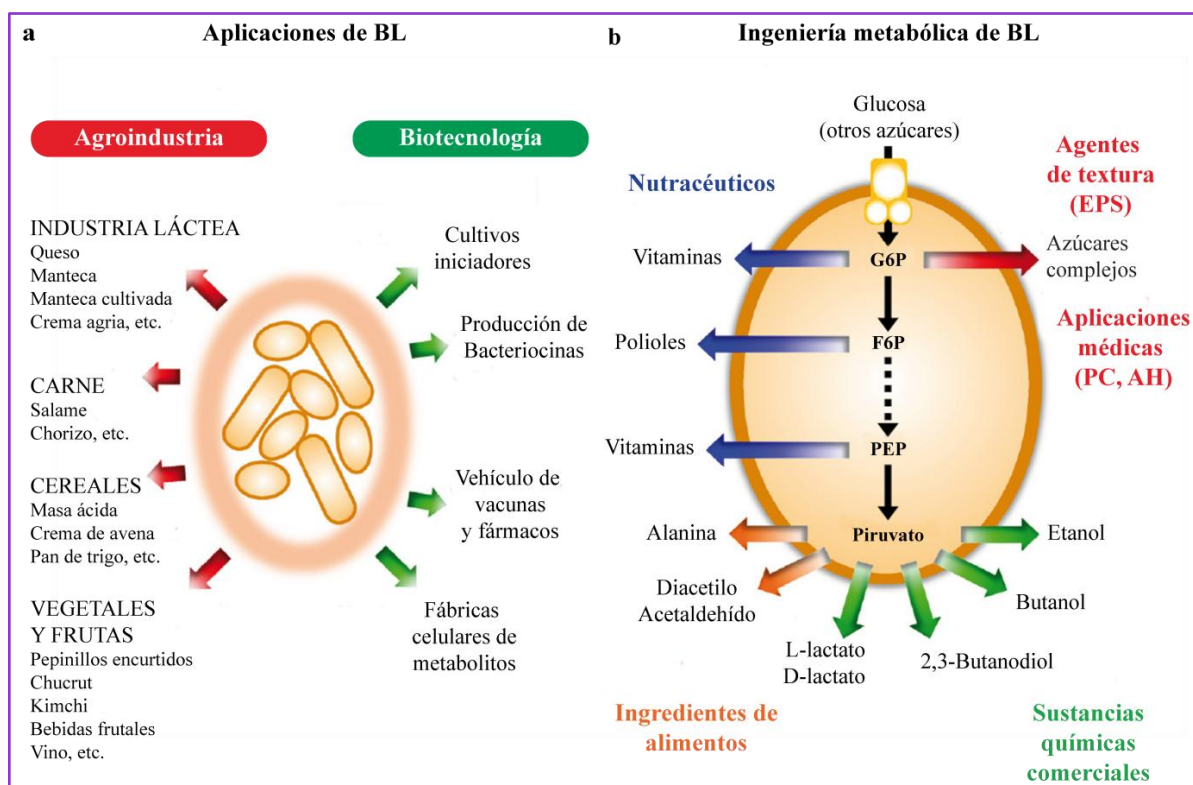


Figura 1.6 Aplicaciones de BL en (a) agroindustria y (b) biotecnología. EPS, exopolisacáridos; PC, polisacáridos capsulares; AH, ácido hialurónico; G6P, glucosa 6-fosfato; F6P, fructosa 6-fosfato; PEP, fosfoenolpiruvato (Modificada de Gaspar y col., 2013).

El desarrollo de herramientas genéticas en la década de 1980 permitió la manipulación dirigida y efectiva del metabolismo de las BL, allanando el camino para nuevas aplicaciones biotecnológicas (Figura 1.6). El advenimiento de la genómica funcional combinada con poderosos sistemas computacionales permitieron el desarrollo de un considerable *pool* de herramientas (estrategias de ingeniería metabólica) para la expresión y secreción de proteínas heterólogas en BL, en particular en el organismo modelo *Lc. lactis* (Morello y col., 2008). Los avances tecnológicos en la última década sentaron las bases para el uso de BL como verdaderas fábricas celulares para la producción de compuestos de alto valor, como enzimas industriales y proteínas de

origen viral, bacteriano o de eucariotas con aplicaciones terapéuticas (Steidler y Rottiers, 2006; Pontes y col., 2011) (Figura 1.6). Las BL diseñadas para sintetizar —y en algunos casos secretar— proteínas terapéuticas pueden además ser utilizadas como vehículos de vacunas y administración de fármacos. *Lc. lactis* fue el primer organismo genéticamente modificado para ser utilizado vivo en el tratamiento de enfermedades en humanos y algunas cepas de lactococos que secretan péptidos y proteínas terapéuticas en el tracto gastrointestinal se encuentran en etapas avanzadas de desarrollo pre-clínico y clínico (Gaspar y col., 2013).

Se han diseñado BL —en particular algunos miembros de los géneros *Lactococcus* y *Lactobacillus*— para la producción de ácido láctico, 1,3-propanodiol, 2,3-butanodiol, biocombustibles, compuestos de aroma, edulcorantes, vitaminas y polisacáridos complejos (Figura 1.6.b). El metabolismo relativamente simple de las BL, sus genomas pequeños (~1,8 a 3,4 Mpb) con escasa redundancia, su crecimiento rápido, las elevadas tasas de captación de azúcar, el potencial de desacoplamiento entre el crecimiento y la producción de metabolitos y los escasos sistemas de control en comparación con otros modelos de ingeniería metabólica (como *E. coli* y *S. cerevisiae*), han contribuido a la generación de fábricas celulares eficientes a partir de BL (Gaspar y col., 2013).

1.5.2. Metabolismo de hidratos de carbono en BL

Dado que las BL no poseen un sistema respiratorio funcional, deben obtener su energía a través de la fosforilación a nivel de sustrato. A partir de diferentes fuentes de carbono, las BL puede producir diversos productos finales de fermentación, estas peculiaridades metabólicas también se han utilizado para la diferenciación taxonómica. De acuerdo a las vías de degradación de azúcares que utilizan, las BL se dividen en homofermentativas y heterofermentativas.

1.5.2.a. BL homofermentativas

Las BL homofermentativas producen ácido láctico como producto principal de fermentación (más del 85%, fermentación homoláctica) en presencia de cantidades no limitantes de hexosas a través de la glicólisis o **vía Embden-Meyerhof-Parnas (EMP)** y

la enzima lactato deshidrogenasa (LDH). Las hexosas se internalizan a través de transportadores de membrana específicos —como permeasas y simportadores— y luego se isomerizan a glucosa o fructosa. Los disacáridos como lactosa o sacarosa pueden hidrolizarse en dos monosacáridos en el medio externo o pueden ser captados como disacáridos y luego ser hidrolizados en el interior de la célula. La ruta catabólica más común es la conversión del disacárido lactosa en lactato y genera 4 moles de ácido láctico y 4 moles de ATP, sin producción de CO₂ (Wisselink y col., 2002; Pessione, 2012). En la Figura 1.7 se muestra la vía de fermentación de hexosas para BL homofermentativas.

Cuando el flujo glicolítico es bajo, las bacterias homofermentativas pueden sufrir un cambio metabólico hacia la fermentación ácido-mixta y producir formiato, acetato, CO₂ y etanol en muy bajas concentraciones, además de lactato. El acetato puede acumularse en el medio de cultivo o bien —dependiendo del pH y de la disponibilidad de NAD(P)H— puede reducirse a etanol con consumo de NAD(P)H. Este cambio se debe a la regulación de las enzimas LDH y formiato piruvato liasa, que están sujetas a control por las tasas de flujo metabólico y los cambios en la relación NAD(P)⁺/NAD(P)H. Esta ruta permite la ganancia adicional de 1 mol de ATP, pero con una menor producción de ácido láctico. Dado que el formiato puede descarboxilarse, por esta vía se puede producir un mol adicional de CO₂ (bacterias productoras de gas) (Zaunmüller y col., 2006; Pessione, 2012).

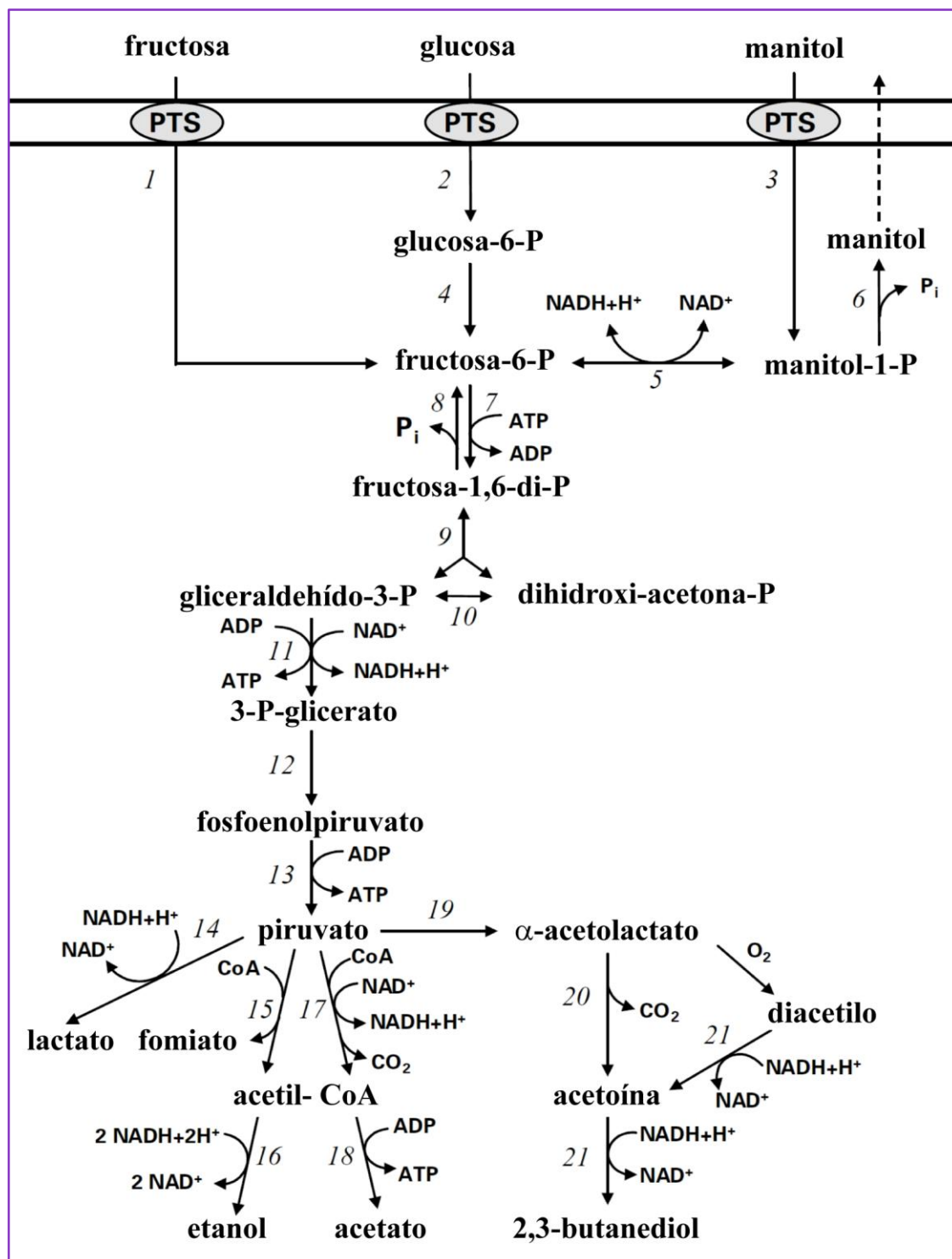


Figura 1.7 Vía de fermentación de hexosas en BL homofermentativas. (1) Sistema fosfoenolpiruvato-fosfotransferasa (PEP-PTS) para fructosa; (2) Sistema PEP-PTS para glucosa; (3) Sistema PTS específico para manitol; (4) Fosfoglucosa isomerasa; (5) Manitol 1-fosfato deshidrogenasa; (6) Manitol 1-fosfatasa; (7) 6-fosfofructoquinasa; (8) Fructosa-difosfatasa; (9) Fructosa 1,6-difosfato aldolasa; (10) Triosafofato isomerasa; (11) Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa y fosfoglicerato quinasa; (12) Fosfogliceromutasa y enolasa; (13) Piruvato quinasa; (14) Lactato deshidrogenasa; (15) Piruvato-formiato liasa; (16) Acetaldehído deshidrogenasa y alcohol deshidrogenasa; (17) Piruvato deshidrogenasa; (18) Acetato quinasa; (19) α-acetolactato sintasa; (20) α-acetolactato descarboxilasa; (21) 2,3-butanediol deshidrogenasa (Modificada de Wisselink y col., 2002).

1.5.2.b. BL heterofermentativas

Las BL heterofermentativas como *Leuconostoc*, *Oenococcus*, y ciertas especies de *Lactobacillus* en general fermentan no solo las hexosas sino también las pentosas a través de la **vía 6-fosfogluconato-fosfocetolasa** (PK, del inglés *phosphoketolase*), también conocida como vía de las pentosas fosfato o vía de Warburg-Dickens (Figura 1.8), que permite la síntesis de otros productos —en concentraciones considerables— además de ácido láctico, como etanol, ácido acético y CO₂. La reacción de síntesis de ácido acético resulta en una ganancia adicional de ATP, sin embargo no es tan frecuente debido a la necesidad de re-oxidación de NADH (Hammes y Vogel, 1995; Wisselink y col., 2002). La enzima específica de esta vía es la D-xilulosa-5P-fosfocetolasa que cataliza la conversión de xilulosa-5P a gliceraldehído-3P (GAP) y acetil-P. Mientras el GAP entra en la glicólisis y se transforma en ácido láctico, el acetil-P se convierte en etanol. La baja actividad acetaldéhidó deshidrogenasa y, en consecuencia, la baja actividad de la vía de etanol para re-oxidar el NAD(P)H, limita el crecimiento de las BL heterofermentativas en glucosa. Cuando O₂, piruvato, citrato o fructosa están presentes en el medio de cultivo, pueden utilizarse como aceptores alternativos de electrones, observándose velocidades de crecimiento mucho más altas (Zaunmüller y col., 2006; Arsköld y col., 2008). El rendimiento energético de esta vía es menor que el de la vía EMP, dando lugar solo a 1 mol de ATP, 0,5 moles de lactato y 0,5 moles de etanol o acetato por mol de hexosa consumido, además de un mol CO₂ derivado de la descarboxilación de la hexosa/pentosa (ruta metabólica productora de gas) (Pessione, 2012).

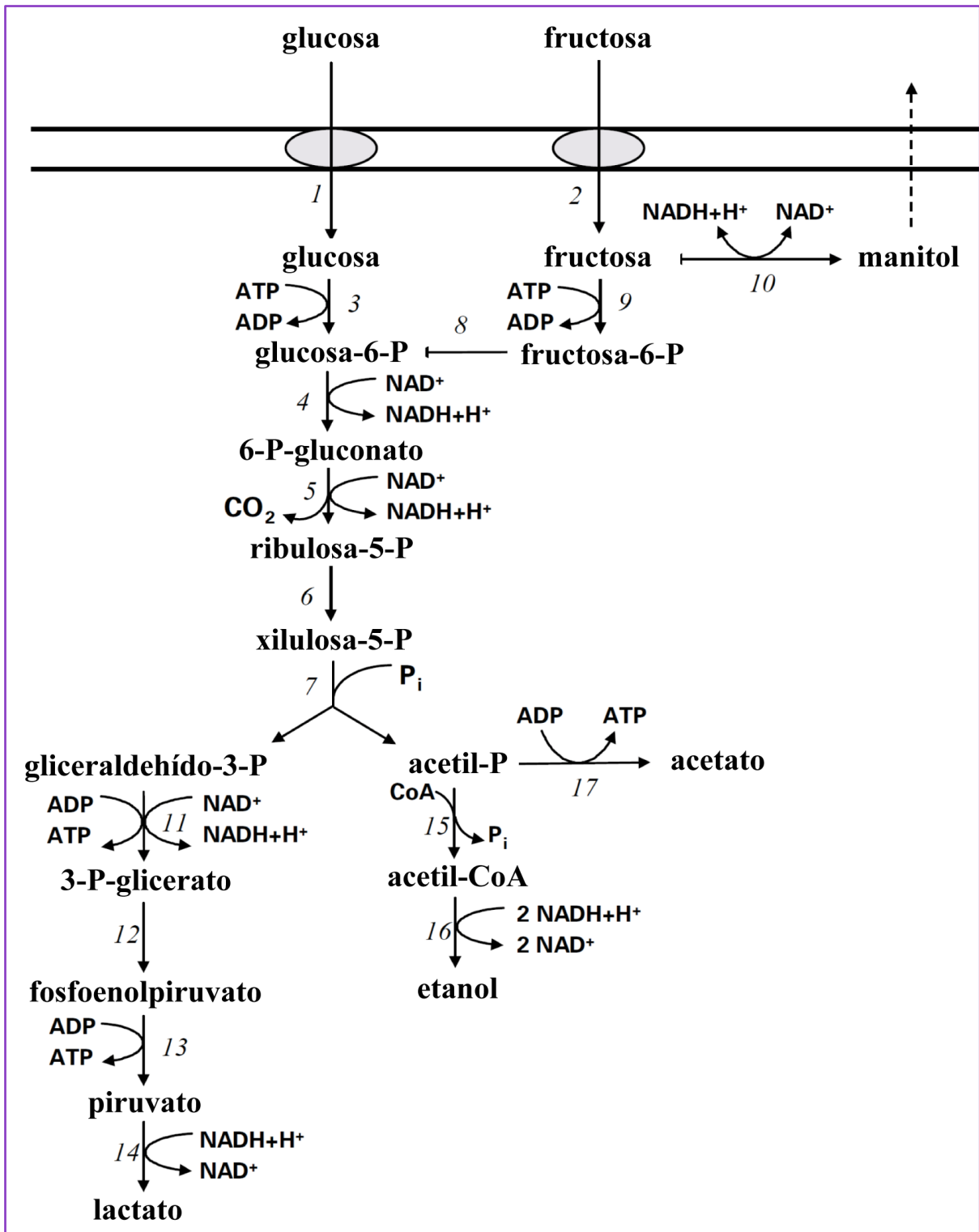


Figura 1.8 Vía de fermentación de hexosas en BL heterofermentativas. (1) Glucosa permeasa; (2) Fructosa permeasa; (3) Glucoquinasa; (4) Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa; (5) 6-fosfogluconato deshidrogenasa; (6) Epimerasa; (7) D-xilulosa-5-fosfato fosfocetolasa; (8) Glucosa-fosfato isomerasa; (9) Fructoquinasa; (10) Manitol 2-deshidrogenasa; (11) Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa y fosfoglicerato quinasa; (12) Fosfogliceromutasa y enolasa; (13) Piruvato quinasa; (14) Lactato deshidrogenasa; (15) Fosfato acetiltransferasa; (16) Acetaldehído deshidrogenasa y Alcohol deshidrogenasa; (17) Acetato quinasa (Modificada de Wisselink y col., 2002).

Las BL heterofermentativas pueden dividirse en facultativas o obligadas: las **BL heterofermentativas facultativas**, fermentan hexosas y pentosas por las vías EMP y PK, respectivamente, mientras que las **BL heterofermentativas obligadas** degradan tanto hexosas como pentosas por la vía PK (Hammes y Vogel, 1995).

1.5.3. Producción biotecnológica de manitol por BL heterofermentativas

En la actualidad diversas BL se utilizan como "fábricas celulares" para la producción de ciertos metabolitos, ya sea para ser utilizados como compuestos purificados o para ser producidos *in situ* en alimentos fermentados. Algunos ejemplos incluyen la producción de bacteriocinas, vitaminas, aminoácidos, polioles, selenoproteínas, etc. (Hugenholtz, 2008; Patra y col., 2009; Pessione y col., 2013). El uso de BL como fábricas celulares se debe a diversas razones, entre las que se pueden destacar que: i) son microorganismos de grado alimenticio, ii) ejercen efectos beneficiosos en el tracto gastrointestinal, iii) sus metabolitos pueden aplicarse directamente en los productos alimenticios, iv) existe una gran disponibilidad de herramientas genéticas para el mejoramiento de cepas y v) la posibilidad de utilizar sustratos económicos para su crecimiento (Wisselink y col., 2002; Fontes y col., 2009; Monedero y col., 2010; Carvalheiro y col., 2011; Ortiz y col., 2012).

Algunas BL heterofermentativas han demostrado ser microorganismos ideales para la producción de polioles (principalmente manitol) ya que muestran un metabolismo fermentativo asociado con una importante modulación redox y una limitada capacidad biosintética. También, como las BL se utilizan en procesos de fermentación de alimentos, la posibilidad de producir polioles *in situ* puede ser útil en el desarrollo de nuevos alimentos funcionales (Monedero y col., 2010). Las BL homofermentativas, que carecen de la enzima MDH y utilizan la vía EMP para la fermentación de azúcares, son incapaces de producir naturalmente manitol. Sin embargo, se ha logrado la síntesis de manitol por estas especies a través de diferentes estrategias de ingeniería metabólica (Akinterinwa y col., 2008; Song y Vieille, 2009; Monedero y col., 2010; Ortiz y col., 2013; Mazzoli y col., 2014), que no serán abordadas en el marco de este trabajo de Tesis.

La producción biotecnológica de manitol representa una alternativa interesante a la producción química industrial actual, y en los últimos 15 años se ha investigado

activamente. Algunas BL heterofermentativas pertenecientes a los géneros *Leuconostoc*, *Oenococcus* y *Lactobacillus* son eficientes productores de manitol a partir de fructosa. La producción de manitol mediante un proceso fermentativo tiene diversas ventajas en comparación con la síntesis química como por ejemplo una conversión completa de fructosa en manitol sin la formación simultánea de sorbitol y el uso de condiciones suaves de producción sin el requerimiento de sustratos puros (Soetaert y col., 1995; von Weymarn y col., 2002).

La producción de manitol por BL heterofermentativas se basa en su capacidad para utilizar fructosa como un aceptor alternativo de electrones, y convertirlo exclusivamente en manitol a través de una reacción enzimática de un solo paso catalizada por la enzima MDH. La formación de manitol permite regenerar equivalentes de NAD(P)⁺ procedentes del metabolismo de los hidratos de carbono y proporciona una ventaja para el crecimiento microbiano gracias a la reacción de MDH que permite la regeneración del *pool* de NAD(P)⁺ (Monedero y col., 2010). Parte del acetyl-P formado durante el metabolismo heterofermentativo se puede canalizar hacia la producción de acetato en lugar de etanol con la ganancia extra de ATP a través de la enzima acetato quinasa, que es la verdadera razón de la reducción de fructosa a manitol resultando en un mayor crecimiento celular. Por lo tanto, además de la producción de ácido láctico y etanol, durante esta conversión se produce acetato (Ver Figura 1.8).

En los últimos años se investigaron diversas BL heterofermentativas por su capacidad para producir manitol. Saha y Nakamura (2003) trabajaron con la cepa de *L. intermedius* NRRL B-3693, capaz de producir hasta 198 g/L de manitol a partir de una alta concentración de fructosa (300 g/L). Por otro lado, se han caracterizado diferentes cepas indígenas productoras de manitol pertenecientes al género *Leuconostoc* aisladas de una amplia gama de alimentos crudos y fermentados (Patra y col., 2011). A la fecha, se demostró la síntesis de manitol a partir de fructosa en cepas de *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. cellobiosus*, *L. fermentum*, *L. intermedius*, *L. kunkeei*, *L. reuteri*, *L. sanfranciscensis*, *Leuc. amelibiosum*, *Leuc. citreum*, *Leuc. citrovorum*, *Leuc. ficulneum*, *Leuc. fructosum*, *Leuc. lactis*, *Leuc. mesenteroides*, *Leuc. paramesenteroides*, *Leuc. pseudomesenteroides*, *Leuc.*

fallax, *Fructobacillus (F.) fructosus* y *F. pseudoficulneus* (Endo y col., 2009; Carvalheiro y col., 2011; Patra y col., 2011; Saha y Racine, 2011; Ortiz y col., 2013).

En este trabajo de Tesis se seleccionó la cepa *L. reuteri* CRL 1101 para realizar los estudios de producción de manitol. Esta cepa fue seleccionada a partir de un *screening* entre 65 cepas de BL heterofermentativas pertenecientes a la Colección de Cultivos de CERELA. La cepa *L. reuteri* CRL 1101 fue la mejor productora de manitol en el medio ensayado y resultó de interés por pertenecer además a una especie comúnmente considerada como probiótica. En base a todos los antecedentes expuestos, se plantearon los siguientes objetivos general y específicos de este trabajo de Tesis:

2. OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar y optimizar la producción de manitol por *L. reuteri* CRL 1101 mediante estudios microbiológicos, bioquímicos y genéticos, como una alternativa prometedora a su producción industrial actual.

Objetivos Específicos

Objetivo 1. Evaluar el efecto de diferentes condiciones de cultivo para optimizar la producción de manitol por *L. reuteri* CRL 1101.

Objetivo 2. Formular un medio de cultivo minimizado empleando una fuente de carbono alternativa para la producción de manitol por *L. reuteri* CRL 1101.

Objetivo 3. Estudiar la actividad de la enzima MDH de *L. reuteri* CRL 1101 bajo diferentes condiciones de cultivo.

Objetivo 4. Estudiar la expresión y regulación del gen *mdh* de *L. reuteri* CRL 1101 bajo diferentes condiciones de cultivo.

Objetivo 5. Evaluar la expresión diferencial de proteínas intracelulares de *L. reuteri* CRL 1101 durante la síntesis de manitol mediante estudios proteómicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los países ricos lo son porque dedican dinero al desarrollo científico-tecnológico, y los países pobres lo siguen siendo porque no lo hacen. La ciencia no es cara, cara es la ignorancia.

Bernardo Alberto Houssay (1887 - 1971)

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. CEPA EN ESTUDIO

3.1.1. Origen

En este trabajo de Tesis doctoral se utilizó la cepa *L. reuteri* CRL 1101, derivada de la cepa tipo DSM 20016, aislada de intestino humano y perteneciente a la Colección de Cultivo del Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA), San Miguel de Tucumán, Argentina. Dicha cepa se seleccionó a partir de un *screening* previo entre 65 cepas de BL heterofermentativas productoras de manitol.

3.1.2. Preservación

Con el fin de conservar la cepa en estudio a largo plazo, se prepararon cultivos *stock* de la siguiente manera: *L. reuteri* CRL 1101 se cultivó en caldo MRS a 37 °C durante 16 h (fase estacionaria). Las células se cosecharon por centrifugación ($10.000 \times g$, 5 min), se resuspendieron en medio protector LEL-Glicerol estéril, concentrando el cultivo 10 veces y se fraccionó en viales estériles (1 mL) que se conservaron a -20 °C hasta su uso.

3.1.3. Propagación

Se obtuvo un cultivo activo de la cepa en estudio mediante dos transferencias sucesivas en caldo MRS (inóculo al 2%, v/v) y una tercera en el medio a utilizar, incubadas a 37 °C durante 8-16 h. La tercera propagación constituyó el cultivo activo, el cual se usó como inóculo. En el caso de los experimentos realizados en medio CDM la tercera propagación se realizó en caldo MRS para asegurar el buen crecimiento del microorganismo. Previa a la inoculación, las células se lavaron tres veces con *buffer* fosfato de potasio 50 mM pH

7,0 para evitar el arrastre de nutrientes residuales provenientes del medio complejo (MRS) durante la inoculación. Finalmente, se resuspendió el *pellet* celular en el mismo *buffer* para utilizarlo como inóculo. Para cada experimento, el medio de cultivo se inoculó hasta alcanzar una densidad óptica (DO_{600}) = $0,07 \pm 0,03$.

3.2. MEDIOS DE CULTIVO

3.2.1. Medio Protector LEL-Glicerol

Medio LEL

| | |
|---------------------------|-------------------|
| Leche descremada en polvo | 10,0 g |
| Extracto de levadura | 0,5 g |
| Glucosa | 1,0 g |
| Agua destilada | c. s. p. 100,0 mL |

Se esterilizó a 115 °C (0,6-0,7 atm de P) durante 20 min.

Se agregó glicerol puro (esterilizado por separado a 121 °C, 20 min) al medio LEL en una concentración final del 10% (v/v).

3.2.2. Caldo MRS

Tabla 3.1 Composición del caldo MRS.

| Componente | Concentración final (g/L) |
|--------------------------------------|---------------------------|
| Peptona de carne | 10 |
| Extracto de carne | 10 |
| Extracto de levadura | 5 |
| Glucosa | 20 |
| K ₂ HPO ₄ | 2 |
| Acetato de sodio | 5 |
| Citrato triamónico | 2 |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0,2 |
| MnSO ₄ ·H ₂ O | 0,05 |
| Tween 80 | 1 |

La composición del caldo MRS se detalla en la Tabla 3.1 (De Man y col., 1960). Se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 20 min. El pH del medio se encuentra alrededor de 6,2-6,6 antes de la esterilización y entre 6,0 y 6,5 luego de la misma. Para obtener MRS agarizado, al caldo MRS, se agregaron 12 g agar/L y se esterilizó en autoclave (121 °C, 20 min).

3.2.3. Medio MRS_{Mel}

3.2.3.a. Preparación de solución madre de melaza al 20% (p/v)

Debido a que el contenido y composición de carbohidratos en la melaza de caña de azúcar varía mucho dependiendo de su origen, se determinó la composición de los dos lotes de melaza utilizados en esta Tesis (obtenidos de ingenios locales) por HPLC (del inglés *High Performance Liquid Chromatography*) tal como se describe más adelante. Luego, se preparó una solución madre de melaza de caña de azúcar al 20% (p/v) de la siguiente manera: se pesó una determinada cantidad de melaza, se disolvió en agua destilada, se centrifugó (10.000 × *g*, 20 min, 4 °C) para eliminar cenizas y partículas en suspensión y se llevó a volumen con agua destilada.

3.2.3.b. Preparación del medio MRS_{Mel}

La solución madre de melaza al 20% (p/v) se agregó a caldos MRS concentrados 2 veces y sin glucosa, en cantidades necesarias para alcanzar concentraciones finales de azúcares totales de 3,0; 5,0; 7,5 o 10,0% (p/v), y se esterilizaron (121 °C, 20 min). Estos medios de cultivo se denominaron MRS_{Mel} 3,0; 5,0; 7,5 y 10,0%, respectivamente.

3.2.4. Medio químicamente definido: CDM

El CDM (del inglés *Chemically Defined Medium*) cuya composición se detalla en la Tabla 3.2, se preparó según Hébert y col. (2004) teniendo en cuenta algunos detalles y modificaciones que se describen a continuación:

- ✓ Se prepararon soluciones *stock* de todos los componentes utilizando agua ultrapura Milli-Q o soluciones acuosas de NaOH; se esterilizaron en autoclave (121 °C, 20 min) o por filtración (membrana de celulosa, poro: 0,22 μm) según el caso, y se almacenaron a 4 °C.
- ✓ Las soluciones de aminoácidos se almacenaron a -20 °C durante 1 mes, a excepción de la solución de tirosina que se almacenó a temperatura ambiente durante una semana y la solución de cisteína que se preparó al momento de usarla, debido a que se oxida rápidamente en contacto con el aire.
- ✓ El ácido glutámico se disolvió en agua, ajustando a pH 7,0 con NaOH 0,1 M.
- ✓ La riboflavina se disolvió en 100 μL de HCl concentrado y luego se agregó la cantidad de agua necesaria para completar la solución.
- ✓ Las soluciones de piridoxal, ácido fólico, vitamina B₁₂ y riboflavina son fotolábiles por lo que se almacenaron a 4 °C al abrigo de la luz.
- ✓ El medio se preparó en el momento de usarlo, o unas horas previas pero nunca fue almacenado por más de 24 h.

Modificaciones del medio CDM aplicadas en esta Tesis:

- ✓ Se modificó la concentración de glucosa de la solución *stock*, de 200 a 400 g/L, para obtener una concentración final de 10 a 20 ó 70 g/L según correspondiera.
- ✓ Se agregó fructosa, 50 g/L concentración final, en experimentos de inducción de la enzima MDH.
- ✓ Se omitió el agregado de FeSO₄·7H₂O e inosina, debido a que no fueron necesarios para el crecimiento de *L. reuteri* CRL 1101.
- ✓ Se modificó la concentración de MnSO₄·H₂O de la solución *stock*, de 2,5 a 5,0 g/L, para obtener una concentración final de 0,050 g/L, debido a que ésta es la concentración requerida para el óptimo crecimiento del microorganismo en estudio.

Tabla 3.2 Composición del medio CDM, solubilidad de los componentes y forma de esterilización de cada uno de ellos.

| Componentes | Concentración stock (g/L) | Concentración final (g/L) | Solubilidad | Forma de esterilización |
|--|---------------------------|---------------------------|-----------------|-------------------------|
| Glucosa | 400 | 20 ó 70 | Agua | Autoclave |
| Fructosa | 400 | 50 ó 0 | | |
| Acetato de sodio | 500 | 5 | | |
| Citrato de amonio | 100 | 1 | | |
| KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ | 60 | 6 | | |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 20 | 0,2 | | |
| MnSO ₄ ·H ₂ O | 5 | 0,05 | | |
| Tween 80 | 20 | 1 | | |
| <i>Aminoácidos</i> | | | | |
| L-Alanina | 10 | 0,1 | Agua | Autoclave |
| L-Arginina | 10 | 0,1 | | |
| L-Asparagina | 20 | 0,2 | | |
| L-Ácido aspártico | 20 | 0,2 | | |
| L-Cisteína | 20 | 0,2 | | |
| L-Glutamina | 20 | 0,2 | | |
| L-Histidina | 10 | 0,1 | | |
| L-Isoleucina | 10 | 0,1 | | |
| L-Leucina | 10 | 0,1 | | |
| L-Lisina | 10 | 0,1 | | |
| L-Metionina | 10 | 0,1 | | |
| L-Prolina | 10 | 0,1 | | |
| L-Serina | 10 | 0,1 | | |
| L-Treonina | 10 | 0,1 | | |
| L-Valina | 10 | 0,1 | | |
| L-Glicina | 10 | 0,1 | | |
| L-Ácido glutámico | 20 | 0,2 | | |
| L-Fenilalanina | 10 | 0,1 | | |
| L-Triptofano | 4 | 0,1 | NaOH 0,2 N | |
| L-Tirosina | 10 | 0,1 | | |
| <i>Bases</i> | | | | |
| Adenina | 1 | 0,01 | Agua | Autoclave |
| Timina | 1 | 0,01 | | |
| Guanina | 1 | 0,01 | NaOH 0,2 N | |
| Xantina | 1 | 0,01 | | |
| Uracilo | 1 | 0,01 | NaOH 0,1 N | |
| <i>Vitaminas</i> | | | | |
| Biotina | 1 | 0,01 | Agua caliente | Autoclave |
| p -Aminobenzoato | 1 | 0,01 | | |
| Pantotenato de | 0,1 | 0,001 | Agua | Filtración |
| Ácido nicotínico | 0,1 | 0,001 | | |
| Tiamina | 0,1 | 0,001 | NaOH 0,1 N | |
| Ácido orótico | 0,5 | 0,005 | | |
| Piridoxal | 0,2 | 0,002 | | |
| Ácido fólico | 0,1 | 0,001 | | |
| Vitamina B ₁₂ | 0,1 | 0,001 | | |
| Riboflavina | 0,1 | 0,001 | HCl conc + Agua | |

3.3. FERMENTACIONES

3.3.1. Efecto de las condiciones de cultivo en la producción de manitol

L. reuteri CRL 1101 se cultivó en caldo MRS bajo diferentes condiciones de cultivo para evaluar el efecto de los diferentes parámetros de fermentación sobre la síntesis de manitol. Las condiciones estudiadas fueron:

3.3.1.a. Tipo y concentración de la fuente de carbono

Se usó caldo MRS sin glucosa suplementado con la fuente de carbono a evaluar (fructosa, mezcla de glucosa:fructosa y melaza de caña de azúcar) en concentraciones de 3,0; 5,0; 7,5 y 10,0% (p/v) de azúcares totales. En el caso de las mezclas glucosa:fructosa las proporciones utilizadas fueron las siguientes: 1:2% (3% de azúcares totales), 1:4% (5% de azúcares totales), 1:6,5% (7,5% de azúcares totales) y 1:9% (10% de azúcares totales). Cuando se utilizó melaza como fuente de carbono, la cepa se propagó dos veces en caldo MRS y la tercera vez en MRS_{Mel} 3,0%, el cual se usó como inóculo (cultivo de 12-16 h) para los medios MRS_{Mel} 3,0; 5,0; 7,5 y 10,0%. Se llevaron a cabo fermentaciones a pH libre a 37 °C durante 48 h en 200 mL de medio de cultivo. Las muestras se tomaron asépticamente a diferentes tiempos (0, 4, 8, 24 y 48 h) de fermentación.

3.3.1.b. Temperatura de incubación

Se evaluó el crecimiento de la cepa y la producción de manitol a 30 y 37 °C en medio MRS_{Mel} 7,5% (cultivo estático, pH libre, 48 h).

3.3.1.c. Agitación de los cultivos

Se evaluó el efecto de la agitación en la producción de manitol. La cepa se cultivó en MRS_{Mel} 7,5% a 100 rpm a pH libre y 37 °C durante 48 h.

3.3.1.d. Fase de crecimiento y tiempo de fermentación

Se evaluó el efecto del agregado de fructosa en diferentes fases de crecimiento sobre la producción de manitol. Se realizaron fermentaciones a pH libre en caldo MRS (glucosa 2,0%, p/v) a 37 °C. Para evaluar el efecto del tiempo de incubación, las fermentaciones se extendieron durante 72 h. La solución de fructosa (5,0%, p/v, conc. final) se agregó a cultivos activos de *L. reuteri* CRL 1101 en diferentes fases de crecimiento (lag: 1 h, logarítmica: 6 h y estacionaria temprana: 10 h).

En todos los casos contemplados en el punto 3.3.1. se tomaron muestras periódicamente y se determinaron los siguientes parámetros:

Crecimiento celular: densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) y recuento de células viables (unidades formadoras de colonias por mL: UFC/mL). El recuento de células viables se realizó mediante la siembra en MRS agar de las muestras (diluciones seriadas en solución fisiológica: NaCl 0,85%, p/v). La velocidad específica de crecimiento máxima (μ_{max} , h^{-1}) se calculó mediante la aplicación de una de las siguientes ecuaciones según corresponda durante la fase de crecimiento exponencial:

$$\mu = [\ln (DO_{t2}/DO_{t1})] / t_2 - t_1$$
$$\mu = [\ln (UFC/mL_{t2} / UFC/mL_{t1})] / t_2 - t_1$$

pH del medio de cultivo: se midió utilizando un medidor de pH digital (Altronix TPX 1).

Azúcares residuales: la determinación de glucosa, fructosa, sacarosa y productos de fermentación como manitol, ácido láctico, ácido acético y etanol se realizó por HPLC como se describe en el punto 3.4.

3.3.2. Formulación de un medio de cultivo minimizado empleando una fuente de carbono alternativa

3.3.2.a. Efecto de sales presentes en el medio MRS sobre el crecimiento celular

Se evaluó el efecto de la presencia y ausencia de cada una de las sales presentes en el caldo MRS sobre el crecimiento de *L. reuteri* CRL 1101 en las concentraciones en que se encuentran normalmente en dicho medio. Para ello se utilizaron medios MRS modificados que se detallan en la Tabla 3.3. Se llevaron a cabo fermentaciones a pH libre a 37 °C durante 24 h determinándose crecimiento celular (DO_{600}) cada 2 h hasta alcanzar la fase estacionaria (8 h); también se tomaron muestras a las 24 h (punto final). Como control positivo se usó caldo MRS y como control negativo, caldo MRS sin sales. Los resultados informados son representativos de tres experimentos independientes y se expresan como la media \pm desviación estándar (SD, *standard deviation*).

Tabla 3.3 Medios de cultivo MRS modificados.

| Medios MRS modificados |
|----------------------------------|
| MRS (Control positivo) |
| MRS sin fosfato de potasio |
| MRS sin acetato de sodio |
| MRS sin citrato de amonio |
| MRS sin sulfato de magnesio |
| MRS sin sulfato de manganeso |
| MRS sin sales (Control negativo) |
| + fosfato de potasio |
| + acetato de sodio |
| + citrato de amonio |
| + sulfato de magnesio |
| + sulfato de manganeso |

3.3.2.b. Crecimiento celular en medios minimizados conteniendo glucosa como fuente de carbono

En base a los resultados obtenidos arriba, se formularon medios de cultivo minimizados denominados A_G-D_G' conteniendo glucosa (2,0%, p/v) como fuente de carbono y diferentes combinaciones de aquellos componentes del caldo MRS necesarios para

promover el crecimiento (% p/v; extracto de levadura 0,5; peptona de carne, peptona de soja o extracto de carne 1,0 y de sulfato de manganeso 0,005). La composición de cada medio se muestra en la Tabla 3.4. *L. reuteri* CRL 1101 no es capaz de crecer en ausencia de extracto de levadura, por lo que este componente se agregó a todos los medios estudiados. Se utilizó caldo MRS como control. Se llevaron a cabo fermentaciones a pH libre en 100 mL de cultivo. El crecimiento celular (DO_{600}) y el pH se evaluaron oportunamente hasta las 24 h. Los valores informados representan las medias \pm SD de tres experimentos independientes.

Tabla 3.4 Composición de medios de cultivo minimizados conteniendo glucosa como fuente de carbono.

| Medios de cultivo | Componentes |
|-----------------------|---|
| A_G | Glucosa, extracto de levadura |
| A_G' | Glucosa, extracto de levadura, MnSO ₄ |
| B_G | Glucosa, extracto de levadura, Peptona de carne |
| B_G' | Glucosa, extracto de levadura, Peptona de carne, MnSO ₄ |
| C_G | Glucosa, extracto de levadura, Peptona de soja |
| C_G' | Glucosa, extracto de levadura, Peptona de soja, MnSO ₄ |
| D_G | Glucosa, extracto de levadura, Extracto de carne |
| D_G' | Glucosa, extracto de levadura, Extracto de carne, MnSO ₄ |

3.3.2.c. Crecimiento celular y producción de manitol en medios minimizados conteniendo melaza como fuente de carbono

Para evaluar la producción de manitol, se reemplazó la glucosa del medio de cultivo por melaza de caña de azúcar como fuente de carbono (7,5%, p/v); en todos los medios minimizados, denominados A_M-D_M' (medios minimizados a base de melaza), se mantuvieron invariables las concentraciones del resto de los componentes presentes en los medios A_G-D_G' (% p/v; extracto de levadura 0,5; peptona de carne, peptona de soja o extracto de carne 1,0 y de sulfato de manganeso 0,005). La composición de cada medio se muestra en la Tabla 3.5. Se utilizó como control positivo MRS_{Mel} 7,5%. En este trabajo de Tesis se utilizaron dos lotes de melaza que fueron provistos por ingenios locales. Se preparó una solución madre de melaza como se describió previamente y se añadió al

medio hasta alcanzar una concentración de azúcar final de 7,5% (p/v). Se llevaron a cabo fermentaciones a pH libre en cultivos de 100 mL. El crecimiento celular (UFC/mL) y el pH se evaluaron hasta las 24 h. Los valores informados representan las medias \pm SD de tres experimentos independientes. El consumo de fructosa, la formación de manitol y el rendimiento se determinaron a las 24 h de incubación. Para los estudios de optimización se seleccionó el medio en el que se detectó la mayor producción de manitol, denominado medio MLC.

Tabla 3.5 Composición de medios de cultivo minimizados conteniendo melaza de caña de azúcar como fuente de carbono.

| Medios de cultivo | Componentes |
|-------------------|---|
| A_M | Melaza, extracto de levadura |
| A_M' | Melaza, extracto de levadura, $MnSO_4$ |
| B_M | Melaza, extracto de levadura, Peptona de carne |
| B_M' | Melaza, extracto de levadura, Peptona de carne, $MnSO_4$ |
| C_M | Melaza, extracto de levadura, Peptona de soja |
| C_M' | Melaza, extracto de levadura, Peptona de soja, $MnSO_4$ |
| D_M | Melaza, extracto de levadura, Extracto de carne |
| D_M' | Melaza, extracto de levadura, Extracto de carne, $MnSO_4$ |

3.3.3. Optimización de la producción de manitol en medio MLC a pH controlado

3.3.3.a. Fermentaciones a pH controlado

Para optimizar la producción de manitol por *L. reuteri* CRL 1101 usando el medio minimizado MLC se realizaron fermentaciones a pH controlado en un fermentador *BioFlo*[®] (New Brunswick Scientific Co. Inc.; Edison, NJ, Estados Unidos) de 2 L de capacidad (Figura 3.1) con agitación suave (100 rpm) a 37 °C durante 24 h.



Figura 3.1 Fermentador *BioFlo*[®] (New Brunswick Scientific Co.).

El pH se mantuvo constante mediante la adición automática de NaOH 5 M estéril. Se estudió el efecto de diferentes valores de pH comprendidos entre 4,8 y 6,0 (con variaciones de 0,2 unidades) sobre el crecimiento celular (recuento de células), consumo de azúcares, producción de ácidos orgánicos y manitol (HPLC), y rendimiento a las 0, 4, 8 y 24 h of incubación. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes y se expresan como la media \pm SD. Se utilizaron como control aquellos cultivos crecidos a pH libre utilizando el mismo medio de cultivo.

3.3.3.b. Efecto de la biomasa inicial sobre la producción de manitol

Los experimentos previos se realizaron utilizando una biomasa inicial (inóculo) de aproximadamente 0,001 g/L (peso seco), correspondiente a un recuento inicial de 1×10^6 log UFC/mL. Para estudiar el efecto del aumento de la biomasa inicial en la producción de manitol, se llevaron a cabo fermentaciones en medio MLC bajo condiciones optimizadas evaluando incrementos de 10, 100, 1000 y 2000 veces la concentración de biomasa inicial (0,01; 0,1; 1 y 2 g/L, peso seco). Para ello, las células crecidas en el mismo medio durante 8 h se cosecharon por centrifugación ($10.000 \times g$, 10 min) a partir de un determinado volumen de medio fermentado para obtener la cantidad de biomasa

deseada, se resuspendieron en el medio MLC y se transfirieron al bioreactor. El volumen de cultivo a centrifugar se determinó a partir del conocimiento previo del peso seco (g/L) de cultivos de 8 h. Las determinaciones de peso seco se llevaron a cabo utilizando un analizador de humedad infrarrojo termogravimétrico MA100C-000230V1 (Sartorius AG; Goettingen, Alemania) (Figura 3.2). Todas las concentraciones de biomasa fueron estudiadas en dos experimentos independientes. Se utilizó como control el cultivo crecido en condiciones optimizadas con una biomasa inicial de 0,001 g/L.

3.3.4. Cálculo de los parámetros de fermentación

La productividad volumétrica de manitol (Q_{Mtl} , g/L h) se calculó como la concentración promedio de manitol (g/L) producida por hora, en un período de tiempo definido (24 h en nuestro caso). El rendimiento (Y_{Mtl} , mol%) representa la eficiencia de conversión de fructosa a manitol, y se calculó como la cantidad (milimoles) de manitol producido en un determinado período de tiempo ($n_{Mtl\ t=x} - n_{Mtl\ t=0}$) dividido en la cantidad (milimoles) de fructosa total (fructosa libre más la fructosa proveniente de la hidrólisis de la sacarosa) consumida en el mismo período de tiempo ($n_{Fru\ t=x} - n_{Fru\ t=0}$) $\times 100$ (von Weymarn, 2002).



Figura 3.2 Analizador de humedad infrarrojo termogravimétrico MA100C-000230V1 (Sartorius AG).

3.3.5. Análisis estadísticos

Las comparaciones entre las diferentes condiciones para cada parámetro estudiado se realizaron mediante el análisis de la varianza (*one-way ANOVA*) seguido de la prueba de Tukey (*Tukey's honest significant difference test*). Un valor de $p < 0,05$ se consideró como estadísticamente significativo.

3.3.6. Aislamiento del manitol producido por *L. reuteri* CRL 1101

Se llevaron a cabo fermentaciones en las condiciones previamente optimizadas utilizando el medio de cultivo minimizado MLC. Una vez finalizado el proceso de fermentación bajo condiciones optimizadas, el cultivo se centrifugó ($10.000 \times g$, 20 min, 4 °C) para remover la biomasa formada y se recuperó el sobrenadante para evitar la formación de espuma durante la etapa de concentración. A 200 mL del sobrenadante se le agregaron 0,5 mL de una solución de antiespumante de grado alimentario RE806 (BioChemical S.A.) al 50% (v/v, dilución final 1/800). Luego el sobrenadante se concentró 5 veces por evaporación a 50 °C, 50 rpm durante 50 min utilizando un evaporador rotatorio *Hei-VAP Advantage* (Heidolph; Schwabach, Alemania) (Figura 3.3). Posteriormente, el sobrenadante concentrado se enfrió a 4 °C para inducir la cristalización y se mantuvo a esa temperatura durante 48 h. Como control de cristalización se utilizó una solución pura de manitol de 190 g/L (teniendo en cuenta que el manitol precipita en una concentración mayor a 180 g/L). Para recuperar los cristales formados se utilizó un embudo con un papel de filtro *Double Rings 102 Qualitative Medium Flow*. La filtración se llevó a cabo en frío inmediatamente después de finalizada la incubación a 4 °C para evitar la disolución de los cristales formados.



Figura 3.3 Evaporador rotatorio *Hei-VAP Advantage* (Heidolph).

3.4. DETERMINACIÓN DE AZÚCARES, ÁCIDOS ORGÁNICOS Y ETANOL POR HPLC

3.4.1. Desproteización de muestras para determinación de azúcares

Los sobrenadantes de cultivos fermentados se centrifugaron ($8.000 \times g$, 10 min) y se desproteizaron utilizando la técnica modificada de Vrancken y col. (2008) de la siguiente manera: a 600 μL de sobrenadante se añadieron 50 μL de Reactivo de Carrez A ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 3,6%, p/v), 50 μL de Reactivo de Carrez B ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 7,2%), 100 μL de NaOH 0,1 M y 200 μL de agua ultrapura Milli-Q (1 mL vol. final) y se mezcló en agitador Vórtex a temperatura ambiente durante 1 min. Luego las muestras se centrifugaron ($14.500 \times g$, 5 min, 4 °C) y se reservaron los sobrenadantes, a los que se les agregó 50 mg de resina básica (Amberlite IR 120, Laboratory Reagents) y 50 mg de resina ácida (Amberlite IR 45, Laboratory Reagents) y se mezcló en agitador Vórtex. Las muestras se centrifugaron ($14.500 \times g$, 5 min, 4 °C) y los sobrenadantes se diluyeron

hasta tener una concentración de azúcares totales menor a 10 g/L (límite de detección de la columna) y se mantuvieron a -20 °C hasta el momento del análisis.

3.4.2. Desproteínización de muestras para determinación de ácidos orgánicos y etanol

Los sobrenadantes de cultivos fermentados se centrifugaron ($8.000 \times g$, 10 min) y se desproteínizaron de la siguiente manera: a 750 μ L de cada sobrenadante se añadieron 250 μ L de ácido tricloroacético (TCA) al 12% (p/v), se mezclaron en agitador Vórtex y se mantuvieron a 4 °C durante 15 min. Luego de centrifugar las muestras ($8.000 \times g$, 10 min), los sobrenadantes se diluyeron de manera de obtener una dilución final de 1/3 (conc. final de TCA: 4%, p/v) y se mantuvieron a -20 °C hasta el momento del análisis.

3.4.3. Determinación de azúcares residuales, manitol, ácidos orgánicos y etanol

Las concentraciones de manitol, azúcares residuales (glucosa, fructosa y sacarosa), ácidos orgánicos y etanol se determinaron por HPLC utilizando un equipo *Smartline Pump 100* (Knauer GmbH; Berlín, Alemania) con detector de índice de refracción *WellChrom K-2301*, acoplado a un inyector automático *Smartline 3800 Plus* y un calefactor para columnas *ZC90* (Zeltec; Buenos Aires, Argentina). Las muestras se filtraron (filtros de 0,2 μ m de poro y 28 mm de diámetro, Sartorius AG) y se inyectaron (20 μ L) en el equipo. Los azúcares residuales y el manitol se analizaron en una columna *Aminex HPX-87P* (Bio-Rad Laboratories Inc.; Hercules, CA, Estados Unidos) a 85 °C utilizando agua ultrapura Milli-Q como fase móvil (flujo: 0,6 mL/min). Los ácidos orgánicos (ácidos láctico y acético) y el etanol se determinaron en una columna *Aminex HPX-87H* (Bio-Rad Laboratories Inc.) a 41 °C usando H₂SO₄ 5 mM como fase móvil (flujo: 0,6 mL/min). Los datos se analizaron con el software *Eurochrom Basic Edition for Windows*.

3.5. ACTIVIDAD MANITOL 2-DESHIDROGENASA (MDH)

3.5.1. Obtención de extractos proteicos intracelulares

Se prepararon extractos proteicos intracelulares a partir de cultivos de diferentes tiempos de incubación. Las células se cosecharon por centrifugación ($8.000 \times g$, 10 min) y se lavaron tres veces con *buffer* fosfato de potasio 50 mM frío pH 5,5. Los *pellets* húmedos se mezclaron con perlas de vidrio (150-212 μm diámetro, Sigma-Aldrich Co.; St. Louis, MO, Estados Unidos) y se resuspendieron en el mismo *buffer* en una relación 1:2:1 (células:*buffer*:perlas). Luego, las células se rompieron usando un disruptor celular *Mini-BeadBeater-8* (Biospec Products Inc.; Bartlesville, OK, Estados Unidos) a velocidad máxima con 5 ciclos de 2 min cada uno, con intervalos en hielo de 2 min entre ciclo y ciclo. Para eliminar los restos celulares y las perlas de vidrio, las muestras se centrifugaron ($14.500 \times g$, 5 min, 4 °C) y los extractos proteicos intracelulares (sobrenadantes) obtenidos se utilizaron inmediatamente para los ensayos enzimáticos.

3.5.2. Determinación de la actividad específica de la enzima MDH

La actividad MDH se determinó de acuerdo al método de Sasaki y col., (2005) modificado por Ortiz y col. (2012) con algunas modificaciones que se detallan a continuación. La actividad MDH se midió espectrofotométricamente en un lector de microplacas *Cary 50 MPR* (Varian Inc.; Palo Alto, CA, Estados Unidos). La desaparición de NADPH (Sigma-Aldrich Co.) se siguió midiendo la absorbancia a 340 nm (ϵ_{340} : 6220/M cm) durante 5 min. La concentración de proteínas de los extractos intracelulares se midió utilizando un reactivo de Bradford concentrado comercial (Bio-Rad Laboratories Inc.) siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando albúmina sérica bovina como estándar (0,05-0,50 mg/mL). Los extractos se diluyeron para obtener una concentración de proteínas de 0,5 mg prot/mL. Los ensayos enzimáticos se llevaron a cabo en un volumen final de 200 μL , conteniendo 50 μL de *buffer* fosfato de potasio 200 mM (pH 5,5), 50 μL de NADPH 2 mM, 50 μL de agua ultrapura Milli-Q y 10 μL del extracto intracelular diluido. Las reacciones se iniciaron con el agregado de 40 μL de fructosa 1 M (Sigma-Aldrich Co.) incubándose a 37 °C durante 2 min. Como controles

negativos se utilizaron blancos de sustrato y de enzima, donde se agregó agua ultrapura Milli-Q en lugar de sustrato o extracto proteico intracelular, respectivamente. Se definió como una unidad (U) de actividad MDH a la cantidad de enzima requerida para catalizar la desaparición de 1 μmol of NADPH por minuto (reacción en sentido de reducción de fructosa) bajo las condiciones experimentales utilizadas. En todos los casos se informó la actividad específica que se expresó como unidades por miligramos de proteínas (U/mg prot). Todos los ensayos enzimáticos se realizaron por duplicado a partir de al menos dos experimentos independientes.

3.6. TÉCNICAS GENERALES DE BIOLOGÍA MOLECULAR

3.6.1. Aislamiento de ADN cromosómico

Para el aislamiento de ADN cromosómico se utilizaron células de *L. reuteri* CRL 1101 provenientes de 5 mL de un cultivo en fase logarítmica, dado que en esta fase las células están en permanente división y la pared celular no es tan rígida, favoreciendo la lisis celular. Las células se cosecharon por centrifugación ($8.000 \times g$, 10 min), se lavaron dos veces con 500 μL de *buffer* TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA- Na_2 1 mM, pH 8) y se resuspendieron en 850 μL de *buffer* SET (NaCl 75 mM, EDTA 25 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 7,5) conteniendo 10 mg/mL de lisozima. La suspensión celular se incubó durante 2 h a 37 °C. Luego se agregaron 85 μL (0,1 vol) de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 10% (p/v) y 20 μL de proteinasa K (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se incubó durante 2 h a 55 °C, mezclando periódicamente por inversión. A continuación se agregaron 0,33 vol de NaCl 5M y 1 vol de solución cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se incubó 30 min a temperatura ambiente mezclando frecuentemente por inversión. Luego se centrifugó ($10.000 \times g$, 10 min) y se recuperó el ADN de la fase acuosa (fase superior) mediante precipitación con 1 vol de isopropanol (o 2,5 vol de etanol absoluto) e invirtiendo suavemente hasta obtener el filamento de ADN. De esta etapa depende el grado de pureza con la que se obtendrá el ADN, por lo que se debe procurar no transferir restos de la interfase. Luego de centrifugar ($10.000 \times g$, 10 min), el precipitado se lavó con etanol 70% (v/v) sin

resuspender y se centrifugó inmediatamente ($10.000 \times g$, 3 min). El ADN obtenido se dejó secar en baño seco (termobloque) a 37 °C durante ~20 min. Luego se resuspendió en 100 µL de *buffer* TE o agua ultrapura Milli-Q esterilizada, se agregó solución de ARNasa (50 µg/mL, conc. final) para eliminar restos de ARN y se incubó durante 30 min a 37 °C. Luego, a un volumen de la muestra se adicionaron 0,1 vol de acetato de sodio 3 M (pH 5,2) y 2,5 vol de etanol 95% (v/v) frío, y se mantuvo durante 20 min a -20 °C. Se centrifugó ($10.000 \times g$, 10 min) y se descartó el sobrenadante. Se lavó con 1 mL de etanol 70% sin resuspender, se centrifugó ($10.000 \times g$, 3 min) y se eliminó el alcohol residual. Finalmente, se dejó secar (37 °C, ~20 min), se resuspendió en 100 µL *buffer* TE o agua ultrapura Milli-Q esterilizada y se guardó en freezer a -20°C hasta su uso.

3.6.2. PCR convencional

Esta técnica se utilizó para evaluar los resultados de la extracción de ADN genómico, la extracción de ARN y de la síntesis de ADNc. Las reacciones de PCR (del inglés *Polymerase Chain Reaction*) se llevaron a cabo en un termocilador *MyCycler™ Thermal Cycler System with Gradient Option* (Bio-Rad Laboratories Inc.). Cada reacción contenía: 2,5 µL de *buffer* 5X; 0,75 µL de MgCl₂ 25 mM; 1,25 µL de cada cebador o *primer*; 0,25 µL de desoxinucleósidos trifosfato (dNTPs) 5 mM; 0,1 µL de ADN polimerasa *GoTaq®* (Promega Co.); 0,5 µL de muestra (ADN, ARN o ADNc) y 5,9 µL de agua ultrapura Milli-Q para obtener un volumen final de 12,5 µL. Las condiciones utilizadas fueron las siguientes: 5 min a 94 °C; 25 ciclos de: 1 min a 94 °C, 1 min a 55 °C y 30 seg a 72 °C; seguido de una extensión final de 5 min a 72 °C.

3.6.3. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

La electroforesis es una técnica comúnmente utilizada para la separación de moléculas tales como ácidos nucleicos y proteínas; en el presente trabajo de Tesis, esta técnica se utilizó para evaluar fragmentos de ADN amplificados por PCR convencional. La velocidad de migración de las moléculas de ADN en un gel de agarosa está determinada por varios factores, entre ellos, el tamaño molecular, la concentración de agarosa, la conformación de la molécula y el voltaje aplicado. En relación al tamaño molecular, las

moléculas de ADN de doble cadena migran a través del gel a una velocidad que es inversamente proporcional al logaritmo (\log_{10}) del número de pares de bases. De esta manera, las moléculas más grandes migran más lentamente debido a que presentan mayor resistencia de fricción y a que ingresan a los poros del gel con menor eficiencia que las moléculas más pequeñas (Sambrook y Russell, 2001). Así, moléculas de ADN de diferente tamaño, migran de forma distinta en un gel de electroforesis y es posible separarlas según su peso molecular. Los fragmentos amplificados se visualizaron mediante electroforesis en geles horizontales de agarosa (90 V, 30-40 min). Junto con las muestras se sembró en cada gel un marcador de peso molecular de 1 Kb o 100 pb (Invitrogen™, Life Technologies Co.) para geles al 0,8 o al 1% (p/v) de agarosa, respectivamente, según el tamaño esperado de los fragmentos a separar utilizándose mayor concentración para separar fragmentos más pequeños. Para la tinción de las bandas se utilizó el colorante fluorescente *GelRed™* (Biotium Inc.; Hayward, CA, Estados Unidos) (dilución 1/10.000).

3.7. EXPRESIÓN RELATIVA Y REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL GEN *mdh* DURANTE LA PRODUCCIÓN DE MANITOL

3.7.1. Medio de cultivo y condiciones de incubación

Para estudiar la expresión del gen *mdh* de *L. reuteri* CRL 1101 durante la producción de manitol, las células se cultivaron en medio CDM en presencia y ausencia de fructosa a 37 °C durante 24 h. De esta manera, las condiciones de cultivo utilizadas fueron las siguientes: CDM glucosa 2%, fructosa 5% (CDM_{GF}, condición de inducción de MDH) y CDM glucosa 7% (CDM_{GF}, control negativo). Se tomaron muestras a las 8 y 24 h de incubación.

3.7.2. Diseño y selección de *primers* para PCR cuantitativa

Los niveles de transcripción del gen *mdh* de *L. reuteri* CRL 1101 en ausencia y presencia de fructosa se analizaron mediante PCR cuantitativa. Para ello se diseñaron *primers*

específicos para dicho gen y para 4 genes normalmente utilizados como genes normalizadores: *16S rRNA*, *gyrB*, *pyrG* y *leuS*. Los *primers* se diseñaron (Sigma-Aldrich Co.) en base a la secuencia del genoma de *L. reuteri* DSM 20016 (cepa tipo) disponible en bases de datos (*GenBank*[®], perteneciente al *National Center for Biotechnology Information, National Institute for Health* de Estados Unidos) utilizando la herramienta *PrimerQuest* (Integrated DNA Technologies Inc.) disponible *online*. Todos los pares de *primers* se diseñaron para obtener fragmentos de entre 100 y 200 pb y con temperaturas de *melting* (*T_m*) similares, entre 68 y 73 °C. En la Tabla 3.6 se muestra la secuencia y la *T_m* de cada par de *primers* y el tamaño de los fragmentos que generan. La especificidad de cada juego de *primers* y los tamaños de los fragmentos se verificó mediante PCR convencional y visualización mediante electroforesis en gel de agarosa.

Tabla 3.6 *Primers* empleados en las reacciones de PCR cuantitativa para la amplificación de fragmentos del gen *mdh* y de los genes evaluados como normalizadores.

| Gen | Primer | Secuencia 5' → 3' | T _m (°C) | Tamaño del fragmento (pb) |
|--|----------------|---------------------------|---------------------|---------------------------|
| <i>mdh</i> : manitol 2-deshidrogenasa | Lr-AD-f | AACCGGAAGCACTTTGGCGTTAAG | 71,3 | 125 |
| | Lr-AD-r | GCAGCTGCAAGTGCTTGTCTTGA | 71,6 | |
| <i>16S rRNA</i> : ARN ribosómico 16S | LrRib-f | TACCAGGTCTTGACATCTTGCGCT | 69,8 | 144 |
| | LrRib-r | ACTAGTAACAAGGGTTGCGCTCGT | 67,7 | |
| <i>gyrB</i> : ADN girasa, subunidad B | <i>gyrB</i> -f | ACCCAGGCAATTCTTCCAATTTCGC | 73,1 | 189 |
| | <i>gyrB</i> -r | ACCATCGACATCCGCATCAGTCAT | 72,5 | |
| <i>pyrG</i> : citidina trifosfato (CTP) sintetasa | <i>pyrG</i> -f | ATCGTTGCTGCCTCTTTAGGACGA | 70,6 | 160 |
| | <i>pyrG</i> -r | GGTCCAAATCAGTTTCTGTGCCGT | 70,9 | |
| <i>leuS</i> : leucina-ARNt ligasa | <i>leuS</i> -f | TGACTGGCCAGAAAGCGTTAAGGA | 71,4 | 126 |
| | <i>leuS</i> -r | TCTGCCCGCGTCGTAAATACTTCA | 71,0 | |

3.7.3. Aislamiento y cuantificación de ARN total

El ARN total se aisló a partir de *pellets* celulares conteniendo aproximadamente 1×10^8 UFC, utilizando el kit *NucleoSpin[®] RNA II* (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG; Düren, Alemania) de acuerdo al protocolo provisto por el fabricante, con las siguientes modificaciones: los *pellets* celulares se resuspendieron en 100 μ L de *buffer* TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8) conteniendo 2 mg/mL de lisozima (Sigma-Aldrich Co.) y se incubaron durante 2 h a 37 °C. Luego, a cada suspensión se agregaron 350 μ L de *buffer* RA1 (provisto en el kit), 3,5 μ L de β -mercaptoetanol y perlas de vidrio (150-212 μ m

diámetro; Sigma-Aldrich Co.) en una relación 1:1 (células:perlas). Posteriormente, las células se rompieron usando un disruptor celular *Mini-BeadBeater-8* (BioSpec Products Inc.) a velocidad máxima con 5 ciclos de 2 min cada uno, con intervalos en hielo de 2 min entre ciclo y ciclo. Para eliminar las perlas de vidrio, las muestras se centrifugaron ($5.000 \times g$, 3 min) y se continuó con el protocolo descrito en el kit [filtración en columnas, centrifugación, agregado de etanol 70% (v/v) al eluido, unión de ARN a columna, desalado, digestión de ADN en columna, lavado y secado de columna, elución del ARN] hasta obtener el ARN purificado y resuspendido en agua ultrapura libre de ADNasas y ARNasas (provista en el kit). Se realizó un tratamiento adicional con ADNasa (provista en el kit) durante 45 min a 37 °C y el ARN se precipitó con etanol absoluto y acetato de sodio 3M (pH 5,4) a -20 °C durante toda la noche. El ARN se centrifugó ($13.000 \times g$, 5 min) y se dejó secar a temperatura ambiente en flujo laminar durante 15 min y se resuspendió en 30 μ L (o lo correspondiente a la mitad de la cantidad original) de agua ultrapura libre de ADNasas y ARNasas. La ausencia de ADN residual se confirmó por PCR convencional utilizando como muestra una alícuota del ARN tratado con ADNasa. El ARN purificado se cuantificó con un fluorómetro *Qubit® 2.0* (Invitrogen™, Life Technologies Co.; Carlsbad, CA, Estados Unidos) utilizando el kit *Qubit® RNA HS Assay Kit* (Molecular Probes™, Life Technologies Co.), y se conservó en alícuotas a -70 °C hasta su uso.

3.7.4. Transcripción reversa. Síntesis y cuantificación de ADN complementario

La síntesis de ADN complementario (ADNc) de cadena simple se realizó mediante transcripción reversa en un termociclador *My Cycler™ Thermal Cycler System with Gradient Option* (Bio-Rad Laboratories Inc.; Hercules, CA, Estados Unidos), utilizando ~0,5 μ g totales de ARN purificado y el kit *SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix* (Invitrogen™, Life Technologies Co.) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La síntesis de ADNc se confirmó por PCR convencional. El ADNc obtenido se cuantificó con un fluorómetro *Qubit® 2.0* (Invitrogen™, Life Technologies Co.) utilizando el kit *Qubit® ssDNA Assay Kit* (Invitrogen™, Life Technologies Co.) y se conservó en alícuotas a -70 °C hasta su uso.

3.7.5. PCR cuantitativa acoplada a transcripción reversa (RT-qPCR) para la cuantificación relativa de la expresión del gen *mdh*

Los ensayos de RT-qPCR se llevaron a cabo en un termociclador *iQTM5 Multicolor Real-Time PCR Detection System iCycler* (Bio-Rad Laboratories Inc.) utilizando como moldes las muestras de ADNc obtenidas previamente. Los productos de amplificación se detectaron utilizando el fluoróforo *SYBR Green* (contenido en el kit *iQTM SYBR[®] Green Supermix*, Bio-Rad Laboratories Inc.). Este fluoróforo se une específicamente al surco menor del ADN de doble cadena y emite fluorescencia. Cada reacción se realizó por duplicado en un volumen final de 20 μ L conteniendo: 10 μ L 1X *iQTM SYBR[®] Green Supermix*, 200 nM (conc. final) de cada *primer* y ~30 ng totales de ADNc. Las condiciones utilizadas fueron: 5 min a 94 °C y 40 ciclos de: 1 min a 94 °C, 1 min a 55 °C y 30 seg a 72 °C, seguidos de una curva de *melting* (81 ciclos de 10 seg a 60 °C). La curva de *melting* de los productos obtenidos permite monitorear la cinética de disociación de los fragmentos amplificados y determinar si la fluorescencia emitida se origina exclusivamente a partir de los fragmentos deseados o si proviene, además, de dímeros de *primers*, en cuyo caso se debe disminuir la concentración de *primers*. Se realizaron controles positivos con ADN cromosómico, y controles negativos sin ADNc (NTC, del inglés *No Template Control*). Para la interpretación de los resultados de expresión relativa del gen *mdh* en las diferentes condiciones con respecto al gen normalizador se utilizó el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Schmittgen y Livak, 2008).

3.8. EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS INTRACELULARES DE *L. reuteri* CRL 1101 DURANTE LA PRODUCCIÓN DE MANITOL

3.8.1. Medio de cultivo y condiciones de incubación

Se procedió a evaluar la expresión diferencial de proteínas intracelulares de la cepa en estudio durante la producción de manitol vs condiciones de no producción, mediante estudios proteómicos aplicando la técnica de electroforesis bidimensional. Para ello, *L.*

reuteri CRL 1101 se cultivó en dos condiciones: CDM glucosa 2%, fructosa 5% (CDM_{GF}, condición de producción de manitol) y CDM glucosa 7% (CDM_G, condición de no producción). Se llevaron a cabo fermentaciones a 37 °C durante 24 h.

3.8.2. Obtención de los extractos proteicos intracelulares

Las células se cosecharon por centrifugación ($8.000 \times g$, 10 min) a las 8 y 24 h de incubación y la obtención de los extractos proteicos intracelulares se realizó como se detalla en el punto 3.5.1. La concentración de proteínas de los extractos se midió utilizando un Reactivo de Bradford concentrado comercial (Bio-Rad Laboratories Inc.) siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando albúmina sérica bovina (0,05-0,50 mg/mL) como estándar. Los extractos proteicos se fraccionaron en alícuotas conteniendo 340 µg de proteínas totales y se conservaron a -70 °C hasta el momento de su uso.

3.8.3. Primera Dimensión: Isoelectroenfoque

En la primera dimensión las proteínas se separaron mediante isoelectroenfoque, técnica mediante la cual las moléculas son sometidas a corriente eléctrica y migran a través de un gradiente de pH hasta alcanzar su punto isoeléctrico, es decir, la posición en la que su carga neta es igual a cero. Se utilizaron tiras de gradiente de pH inmovilizado *ReadyStrip™ IPG-strips* (Bio-Rad Laboratories Inc.) de 18 cm de longitud y un rango de pH 4-7. Estas tiras están compuestas por un gel de acrilamida co-polimerizada con las llamadas "inmobilinas", que son moléculas que generan el gradiente de pH.

3.8.3.a. Preparación de la muestra

Digestión del ADN por tratamiento con nucleasa. Las muestras se trataron con la nucleasa *Benzonase®* (Novagen®, Merck Millipore) 25 U/µL (conc. final, 1 µL por cada 100 µL) y 1 µL de MgSO₄ 1 M y se incubaron a 37 °C durante 30 min. En los casos en los que el volumen fue menor a 100 µL, se adicionó agua ultrapura Milli-Q para completar el volumen correspondiente.

Precipitación de proteínas con acetona. A un volumen de cada muestra se agregaron 3 vol de acetona fría y se mantuvieron a -20 °C durante toda la noche. Las muestras se centrifugaron ($12.000 \times g$, 12 min, 4 °C), se eliminó la acetona y se dejó secar en baño seco (termobloque) a 93 °C durante 1 a 3 min.

3.8.3.b. Hidratación pasiva

Soluciones

Solución de Desnaturalización

| | |
|------------------|--------------|
| Urea | 3,94 g |
| Tiourea | 1,65 g |
| Agua bidestilada | c.s.p. 10 mL |

Solución de Solubilización (S) (para 12 muestras)

| | |
|-------------------------------|--------------|
| CHAPS | 20,0 mg |
| Ditiotreitol (DTT) | 8,0 mg |
| Tris-Cl 2M pH 8,8 | 10,0 μ L |
| Solución de desnaturalización | 0,5 mL |

Solución de Rehidratación (R) (para 12 muestras)

| | |
|-------------------------------|-------------------|
| CHAPS | 240 mg |
| DTT | 96 mg |
| IPG (pH 4-7) | 120 μ L |
| Azul de bromofenol | punta de espátula |
| Solución de desnaturalización | 6 mL |

Procedimiento. Se procedió a la hidratación pasiva (sin aplicación de corriente eléctrica) de las tiras de inmobilinas con la Solución R conteniendo las muestras a analizar. Para ello, las proteínas precipitadas previamente, se solubilizaron en 40 μ L de Solución S, y se diluyeron con 300 μ L de Solución R, se mezclaron en agitador Vórtex y se centrifugaron ($3.500 \times g$, 10 min). El dispositivo de hidratación *Immobiline DryStrip Reswelling Tray* (GE, Healthcare) fue nivelado y las muestras se colocaron cuidadosamente en las diferentes calles. Las tiras se ubicaron sobre las muestras (el lado correspondiente al gel hacia abajo), evitando la formación de burbujas. Las tiras se cubrieron con cantidad suficiente de aceite mineral *Dry Strip Cover Fluid* (GE, Healthcare) y la hidratación pasiva se llevó a cabo a temperatura ambiente al abrigo de la luz durante 20 a 24 h.

3.8.3.c. Isoelectroenfoque

Luego de la hidratación, las tiras se escurrieron en papel absorbente y se colocaron a la placa de cerámica *Manifold Polymeric Tray* (GE, Healthcare) con el extremo anódico (+) hacia el extremo en forma de T de la placa *Manifold* y se cubrieron con 108 mL de aceite mineral. La placa *Manifold* se ubicó en el equipo *Ettan IPGphor 3* (GE, Healthcare) (Figura 3.4), previamente nivelado. Ambos extremos de las tiras se cubrieron con almohadillas de papel hidratadas con 150 μ L de agua bidestilada, de manera que queden solapadas con el extremo del gel. Se ubicaron los ensamblajes de los electrodos sobre las almohadillas, controlando que las puntas de los electrodos se encuentren en contacto con la base de oro del equipo. Se aplicó el siguiente programa desarrollado para proteínas intracelulares de BL, sin exceder los 75 μ A por tira:

| | |
|------------------------------|-----------------|
| a) Lineal: 500V 1 h | 500 Vh |
| b) Gradiente: 1000V 8 h | 6000 Vh |
| c) Gradiente: 8000V 6 h | 27000 Vh |
| <u>d) Lineal: 10000V 2 h</u> | <u>20000 Vh</u> |
| Total | 53500 Vh |

Se dejó proceder el programa hasta su finalización, luego se recuperaron las tiras escurriéndolas cuidadosamente en papel absorbente y se las conservó a -70 °C hasta el momento de la segunda dimensión.



Figura 3.4 Equipo de isoelectroenfoque *Ettan IPGphor 3* (GE, Healthcare).

3.8.4. Segunda Dimensión: Electroforesis vertical en geles de poliacrilamida

La segunda dimensión consistió en electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE, del inglés *polyacrilamide gel eletrophoresis*) en presencia de SDS (SDS-PAGE). Los geles se corrieron en un sistema de electroforesis vertical *Ettan™ DALTsix, Large Vertical System* (GE, Healthcare) (Figura 3.5) para electroforesis en paralelo de hasta 6 geles de 20 × 20 cm, donde las proteínas cargadas negativamente por tratamiento con SDS se separan por peso molecular.



Figura 3.5 Cuba de electroforesis vertical *Ettan™ DALTsix, Large Vertical System* (GE, Healthcare)

3.8.4.a. Preparación de geles de poliacrilamida

Soluciones

Solución de acrilamida-bisacrilamida

Acrilamida 29,85% (p/v)

Bisacrilamida 0,15% (p/v)

Se filtró en papel de filtro *Double Rings 102 Qualitative Medium Flow* y se conservó a 4 °C al abrigo de la luz

Solución para geles de poliacrilamida (30% T-0,5% C) al 12,5% (para 6 geles)

Solución acrilamida-bisacrilamida 172,00 mL

| | |
|--------------------------------|----------------|
| Tris-HCl 3 M pH 8,8 | 106,53 mL |
| SDS 20% (p/v) | 4,31 mL |
| Agua bidestilada | 57,46 mL |
| Glicerol 50% (v/v) | 86,21 mL |
| Persulfato de amonio 10% (p/v) | 2,70 mL |
| TEMED | 354,00 μ L |

Procedimiento. Se montó el dispositivo y se agregó la solución de acrilamida-bisacrilamida (12,5%) a velocidad constante y en forma continua hasta 1 cm antes del borde del vidrio, evitando la formación de burbujas que puedan interferir en la polimerización. Inmediatamente se adicionaron ~2 mL de mezcla isopropanol:agua (2:3) a lo largo de cada gel para nivelarlos, y se dejaron polimerizar durante aprox. 1 h. Una vez polimerizados los geles, la parte superior de cada gel se enjuagó con agua bidestilada.

3.8.4.b. Equilibrado de las tiras de inmobilinas

Soluciones

Solución Base (B) (para 6 tiras)

| | | |
|------------------------|--------|---|
| Tris 1M pH 6,8 | 15 mL | |
| Urea | 108 g | |
| SDS | 3 g | |
| Agua ultrapura Milli-Q | 105 mL | → Mezclar en agitador hasta obtener una solución homogénea (~20 min), luego agregar |
| Glicerol (87%) | 90 mL | |
| Agua ultrapura Milli-Q | c.s.p. | 300 mL |

Solución de Equilibrado N° 1 (para 6 tiras)

| | |
|------------|--------|
| DTT | 501 mg |
| Solución B | 60 mL |

Solución de Equilibrado N° 2 (para 6 tiras)

| | |
|--------------------|-------------------|
| Iodoacetamida | 1,8 g |
| Solución B | 60,0 mL |
| Azul de bromofenol | punta de espátula |

Procedimiento. Luego del isoelectroenfoque, las tiras de inmobilinas se escurrieron en papel absorbente y se enjuagaron 2 veces con 5 mL de Solución B preparada en el momento, se colocaron en tubos de vidrio con tapa a rosca conteniendo 10 mL de Solución de Equilibrado N° 1, evitando que el gel de las tiras entre en contacto con el

vidrio y se incubaron en agitación suave (en vaivén) durante 15 min. Transcurrido este tiempo, las tiras se enjuagaron nuevamente con Solución B (2 lavados con 5 mL cada uno) y se transfirieron cuidadosamente a otros tubos conteniendo 10 mL de Solución de Equilibrado N° 2. Se incubaron nuevamente en agitación suave durante 15 min adicionales y se realizó un último lavado con 5 mL de solución B.

3.8.4.c. Siembra de las tiras y migración

Buffer de migración 2X

| | |
|------------------------|------------|
| Tris Base (50 mM) | 24,16 g |
| Glicina (384 mM) | 115,20 g |
| SDS (0,2% p/v) | 8,00 g |
| Agua ultrapura Milli-Q | c.s.p. 4 L |

Se colocaron las tiras con ayuda de dos pinzas sobre el vidrio, cuidando que el extremo positivo se encuentre hacia la izquierda y el lado correspondiente al gel hacia el frente. Se adicionaron ~3 mL de agarosa de bajo punto de fusión al 0,8% (p/v, en *buffer* Tris-HCl 1M pH 6,8) para ayudar al descenso de la tira, cuidando que no queden burbujas. Las placas se montaron sobre el dispositivo y se colocaron en la cuba, a la que se agregaron 1,2 L de *buffer* de migración 2X frío en la cámara superior y 4 L de *buffer* de migración 1X frío. Las condiciones de migración fueron:

Paso 1: 20 °C, 10 mA/gel durante 1 h (60 mA p/6 geles)

Paso 2: 20 °C, 20 mA/gel (120 mA p/6 geles)

La migración electroforética se realizó a 15-16 °C con ayuda de una bomba y un baño termostatzado durante aprox. 20 h o hasta que el frente de corrida llegue al final del gel.

3.8.4.d. Tinción de los geles

Al finalizar la migración, los geles se retiraron cuidadosamente de la cuba y se lavaron 3 veces con agua bidestilada durante 5 min con agitación suave (en vaivén) para eliminar los restos de reactivos. Los geles se revelaron con solución colorante compuesta por: *Coomassie Brilliant Blue G-250* (Bio-Rad Laboratories Inc.) 0,12%, sulfato de amonio 10%, ácido fosfórico 10% y metanol 20% (conc. finales) (Candiano y

col., 2004). La tinción se llevó a cabo durante 1 h en agitación suave (en vaivén) y la decoloración se realizó mediante 3 lavados sucesivos de 30 min con agua bidestilada.

3.8.5. Densitometría de los *spots* obtenidos por 2DE

Los geles se escanearon (*Image Scanner III*, GE Healthcare; Cleveland, Ohio, Estados Unidos) y se conservaron en agua bidestilada a 4 °C hasta el momento del corte de los *spots*. Las imágenes escaneadas se alinearon y se analizaron por densitometría con el programa *Prodigy SameSpot* (Nonlinear Dynamics Group; Newcastle, Reino Unido). Este programa asigna a cada *spot* un volumen correspondiente a la intensidad del mismo y compara las intensidades de cada *spot* en las diferentes condiciones estudiadas. Se tomaron como referencia las intensidades obtenidas solo en presencia de glucosa.

3.8.6. Identificación de *spots* por espectrometría de masas MALDI-TOF

Luego del análisis se seleccionaron 36 *spots* los cuales se escindieron de los respectivos geles y se conservaron a -20 °C hasta su identificación mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, llevada a cabo en el servicio ofrecido por el *Centro de Estudios Químicos y Biológicos por Espectrometría de Masa MALDI-TOF (CEQUIBIEM)* perteneciente a la *Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires* y a *CONICET*. Los *spots* fueron digeridos a péptidos con tripsina y posteriormente ionizados utilizando como matriz el ácido α -ciano-4-hidroxicinámico. La identidad de las proteínas se determinó utilizando el programa *Mascot* (disponible *online*), en base al genoma de *L. reuteri* DSM 20016 (cepa tipo) disponible en bases de datos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La duda es uno de los nombres de la inteligencia.

Jorge Luis Borges (1899-1986)

CAPÍTULO I: OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE MANITOL POR *Lactobacillus reuteri* CRL 1101

4.1. Introducción

Las BL heterofermentativas que pertenecen a los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Oenococcus* se encuentran entre los microorganismos más eficientes para la producción de manitol a partir de fructosa (von Weymarn y col., 2002; Wisselink y col., 2002; Saha y Racine, 2011). En general, la producción microbiana de manitol puede realizarse a partir de mezclas de glucosa y fructosa, donde la glucosa se utiliza como fuente de carbono y energía, y la fructosa se reduce a manitol por acción de la enzima MDH. Para producir manitol mediante fermentación microbiana a escala industrial y a costos redituables, se necesita reemplazar sustratos costosos por fuentes de carbono y nitrógeno alternativas más económicas (Song y Vieille, 2009). Para ello se han investigado algunos sustratos alternativos de bajo costo tales como jarabe de algarroba (Carvalho y col., 2011), inulina (Saha, 2006c), licor de maíz, jarabe de alto contenido en fructosa, peptona de soja y/o melaza de caña de azúcar (Saha, 2006a, b).

En Argentina la producción de azúcar en los últimos 5 años (2009-2013) fue de 25.316.000 toneladas/año, por lo que nuestro país se encuentra dentro de los diez principales países productores de azúcar a partir de caña (Dirección de Estadística de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/home/S>). Tucumán se encuentra entre las principales provincias productoras, motivo por el cual en este trabajo de Tesis se plantea evaluar la melaza de caña de azúcar —uno de los principales subproductos de la industria azucarera— como sustrato para la producción de manitol. La melaza de caña de azúcar está compuesta principalmente por azúcares y por un amplio rango de

sustancias, tales como iones metálicos, nitratos, sulfatos, aminoácidos, vitaminas, dextranos y cenizas, entre otros. Los azúcares representan alrededor del 50% (p/p) del peso total siendo la sacarosa el azúcar mayoritario (40%, p/p) y el 10% (p/p) restante está compuesto por glucosa y fructosa libres en concentraciones similares. Estos monosacáridos provienen de la hidrólisis de la sacarosa que ocurre durante el proceso de producción y refinamiento del azúcar (Castillo y Forero, 2007). El rango de aplicaciones de la melaza en diferentes procesos productivos está en constante expansión, entre los que podemos mencionar la producción de etanol (Sheoran y col., 1998; Mukhtar y col., 2010) y ergosterol (He y col., 2007) por levaduras, la síntesis de celulosa bacteriana por algunas especies del género *Acetobacter* (Bae y Shoda, 2004) y la producción de ácido láctico por BL (Wee y col., 2004; Dumbrepatil y col., 2008). Así, la melaza de caña de azúcar constituye una importante fuente de carbono y energía para la producción microbiana de compuestos de valor agregado.

En este capítulo se detallan los estudios realizados para la optimización de las condiciones de cultivo para la producción de manitol por *L. reuteri* CRL 1101. Se estudió el efecto del tipo y concentración de la fuente de carbono, la agitación de los cultivos, la fase de crecimiento en la que se encuentra el microorganismo y el tiempo de fermentación en la producción de manitol. Además, se evaluó la actividad MDH en distintas condiciones de cultivo para su correlación con la formación de manitol.

4.2. Resultados

4.2.1. Efecto del tipo y concentración de la fuente de carbono

Con el fin de determinar cuál es la fuente de carbono más favorable para la producción de manitol por *L. reuteri* CRL 1101 y si la presencia de elevadas concentraciones de azúcares (estrés osmótico) en el medio de cultivo favorece la síntesis del polirol, se estudió el efecto de diferentes fuentes de carbono tales como fructosa, mezcla de glucosa y fructosa, y melaza de caña de azúcar, en concentraciones entre 3,0 y 10,0% (p/v) de azúcares totales. Se llevaron a cabo fermentaciones en caldo MRS sin glucosa suplementado con la fuente de carbono a evaluar, a pH libre y 37 °C durante 48 h. Se estudió la cinética de crecimiento, el consumo de azúcares, la formación de productos finales y la producción de manitol por la cepa en estudio.

4.2.1.a. Fructosa

Estudios preliminares revelaron que *L. reuteri* CRL 1101 no es capaz de crecer en caldo MRS conteniendo fructosa 2,0% (p/v) (MRS_F) como única fuente de carbono luego de 24 h de incubación (DO_{600} : $0,6 \pm 0,1$) y luego de dos repiques sucesivos en dicho medio (Figura 4.1). Por lo tanto, para favorecer el crecimiento celular, se agregó al medio MRS_F una mínima concentración de glucosa (0,1%, p/v). En estas condiciones la cepa alcanzó una DO_{600} de solo $1,0 \pm 0,2$ luego de 24 h, valor que resultó bajo en comparación con los alcanzados en caldo MRS conteniendo glucosa 2,0% (p/v) (MRS_G, control) en el mismo tiempo de incubación (DO_{600} : $4,2 \pm 0,7$) (Figura 4.1). Por este motivo, a continuación se evaluaron mezclas de glucosa y fructosa usando glucosa al 1,0% y concentraciones variables de fructosa.

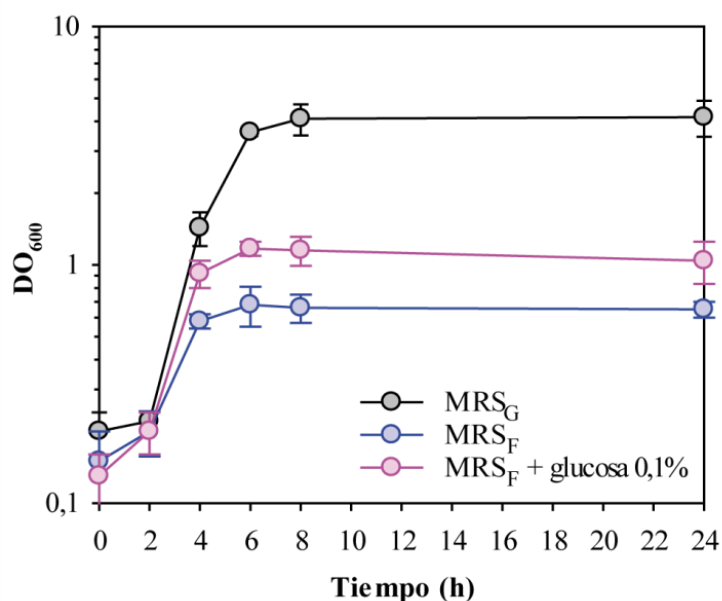


Figura 4.1 Crecimiento de *L. reuteri* CRL 1101 en caldo MRS conteniendo glucosa y/o fructosa como fuentes de carbono en cultivos estáticos a pH libre a 37 °C durante 24 h.

4.2.1.b. Mezclas de glucosa y fructosa

L. reuteri CRL 1101 se cultivó en caldo MRS conteniendo glucosa 1,0% (p/v) y diferentes concentraciones de fructosa: 2,0; 4,0; 6,5 y 9,0% (p/v); los medios se denominaron MRS_{GF} 3,0; 5,0; 7,5 y 10,0%, respectivamente. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.2.

En todos los casos los mayores valores de DO₆₀₀ (entre 6,4 y 7,5) se observaron a las 8 h mientras que los recuentos celulares máximos se encontraron a las 12 h (9,2-9,3 log UFC/mL) (Figuras 4.2.a y 4.2.g). La viabilidad celular no se vio afectada a lo largo de la fermentación alcanzando recuentos celulares de entre 8,5 ± 0,3 y 8,9 ± 0,1 log UFC/mL (MRS_{GF} 3,0 y 5,0%, respectivamente) (Figuras 4.2.a y 4.2.c) al final de la fermentación. En todos los medios estudiados, el pH disminuyó aproximadamente 2 unidades luego de 8 h de incubación (desde 6,0-6,4 hasta 4,4-4,5) y se mantuvo estable hasta el final del período de incubación.

Respecto al consumo de azúcares, la glucosa se consumió por completo en todos los medios luego de 8 h (Figuras 4.2.b, d, f y h). El agotamiento de la glucosa provocó una detención tanto del crecimiento celular como del consumo de fructosa. Solo en el medio

MRS_{GF} 3,0% la fructosa se consumió prácticamente por completo durante las primeras 8 h, quedando una escasa concentración (10 ± 3 mM) sin consumir al final de la fermentación (Figura 4.2.b). En los medios MRS_{GF} 5,0; 7,5 y 10,0% la cantidad de fructosa remanente fue de 59 ± 11 , 190 ± 14 y 320 ± 28 mM, respectivamente, a las 48 h de incubación.

La producción de manitol estuvo asociada al crecimiento celular, a las 8 h de fermentación (fase logarítmica tardía) se observaron concentraciones de entre 82 y 122 mM del polirol. A partir de este momento la producción se mantuvo estable, con leves incrementos hasta las 48 h, principalmente en los medios conteniendo 5,0 y 7,5% de azúcares totales. *L. reuteri* CRL 1101 produjo una concentración máxima de manitol de 171 ± 16 mM (31 ± 3 g/L) a partir de 7,5% de azúcares totales (1:6,5% glucosa:fructosa) a las 48 h (Figura 4.2.f); este valor no fue estadísticamente diferente al observado a las 24 h (137 ± 27 mM, 25 ± 5 g/L) (Tabla 4.1). En estas condiciones la fructosa solo se usó como aceptor alternativo de electrones reduciéndose exclusivamente a manitol, obteniéndose rendimientos (Y_{Mtl}) cercanos al 100%. Con esta concentración de azúcares totales también se registró la mayor productividad volumétrica (Q_{Mtl} : 1,042 g/L h). El incremento en la concentración de azúcares (10,0%) resultó en una disminución de la producción de manitol, mostrando valores de 121 ± 22 mM (22 ± 4 g/L) a las 24 h.

Tabla 4.1 Consumo de fructosa, producción de manitol, rendimiento (Y_{Mtl}) y productividad volumétrica (Q_{Mtl}) por *L. reuteri* CRL 1101 en medios MRS_{GF} a las 24 h de incubación.

| Medio de cultivo | Consumo de fructosa (mM) | Manitol | | Y_{Mtl} (%) | Q_{Mtl} (g/L h) |
|------------------------------|--------------------------|--------------|------------|---------------|-------------------|
| | | mM | g/L | | |
| MRS_{GF} 3,0% | 115 ± 9 | 116 ± 6 | 21 ± 1 | 101 | 0,875 |
| 5,0% | 145 ± 6 | 121 ± 15 | 22 ± 3 | 83 | 0,917 |
| 7,5% | 144 ± 12 | 137 ± 27 | 25 ± 5 | 95 | 1,042 |
| 10,0% | 131 ± 14 | 121 ± 22 | 22 ± 4 | 92 | 0,917 |

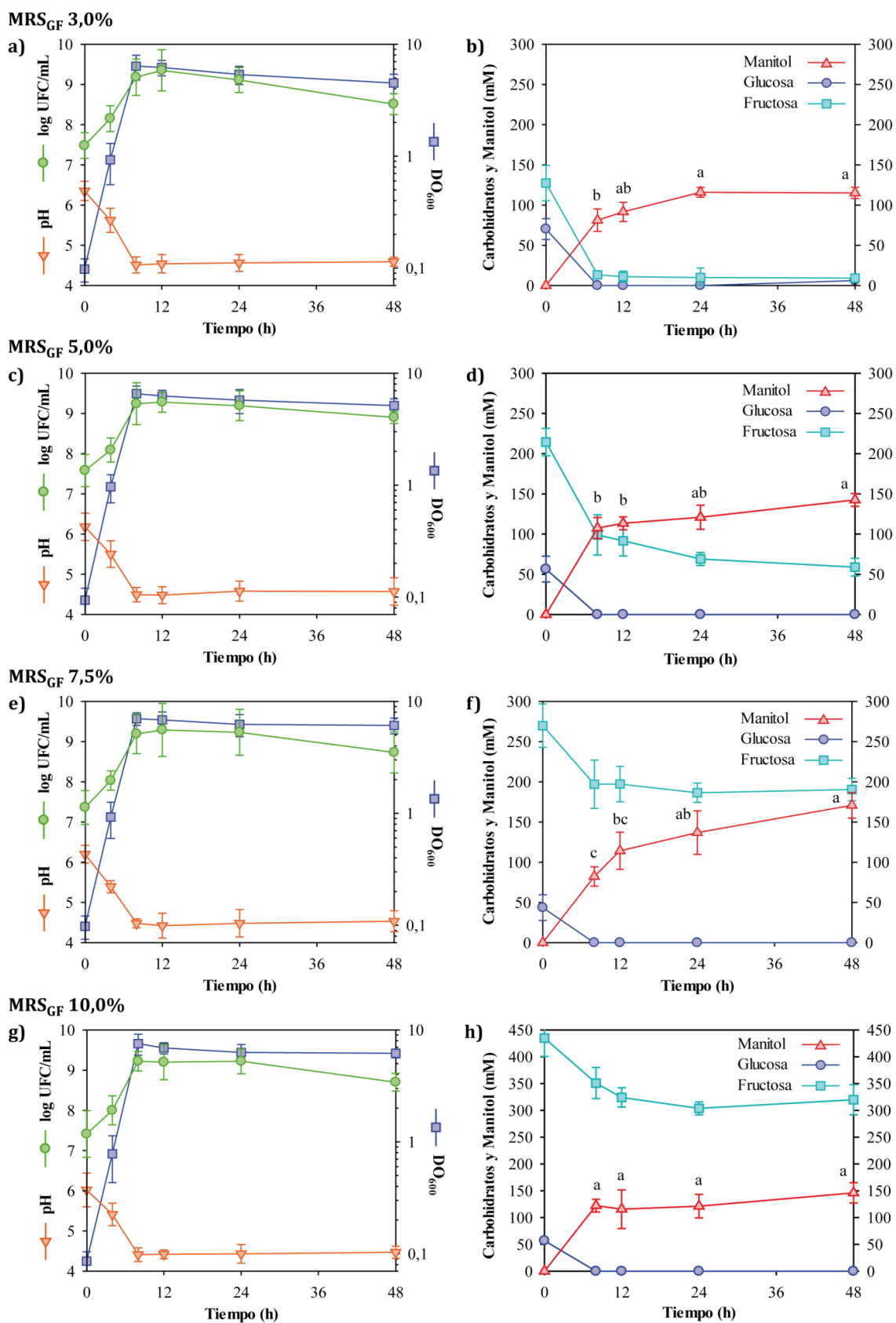


Figura 4.2 Crecimiento celular, consumo de azúcares y producción de manitol por *L. reuteri* CRL 1101 en medios MRS_{GF} 3,0% (a-b), MRS_{GF} 5,0% (c-d), MRS_{GF} 7,5% (e-f) y MRS_{GF} 10,0% (g-h) en cultivos estáticos a pH libre incubados a 37 °C durante 48 h. Los valores con distintas letras (a-c) se consideran estadísticamente diferentes ($p > 0,05$).

4.2.1.c. Melaza de caña de azúcar

Con el fin de evaluar la conveniencia de usar melaza de caña de azúcar como fuente de carbono para la producción de manitol, se llevaron a cabo fermentaciones en caldo MRS sin glucosa suplementado con melaza. Previamente, se determinó por HPLC la composición en carbohidratos de dos lotes de melaza de caña de azúcar provenientes de diferentes ingenios de la Provincia de Tucumán, los cuales fueron utilizadas en este trabajo de Tesis. La composición de azúcares, expresada como g de azúcar cada 100 g de melaza (% p/p) fue la siguiente: sacarosa $40,4 \pm 2,3$; glucosa $4,0 \pm 1,3$ y fructosa $5,0 \pm 1,3$ (azúcares totales: $49,3 \pm 0,4$).

Se investigó el crecimiento y la producción de manitol por *L. reuteri* CRL 1101 a partir de melaza en caldo MRS sin glucosa suplementado con diferentes concentraciones (3,0-10,0%, p/v) de azúcares totales provenientes de melaza (medios MRS_{Mel} 3,0-10,0%). Se evaluó el crecimiento celular, el consumo de azúcares, la producción de manitol y la formación de productos finales, tales como ácidos orgánicos y etanol. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.3.

En todos los medios evaluados los máximos recuentos celulares (9,3-9,5 log UFC/mL), se alcanzaron a las 12 h de incubación (al igual que en los medios MRS_{GF}) obteniéndose el valor máximo de $9,5 \pm 0,2$ log UFC/mL en el medio MRS_{Mel} 3,0% (Figura 4.3.a). En todos los medios evaluados la viabilidad celular disminuyó alrededor de una unidad logarítmica a las 48 h, mostrando recuentos celulares de 8,3 a 8,4 log UFC/mL. En todos los casos el pH disminuyó a valores de 4,3-4,6 durante las primeras 12 h manteniéndose estable hasta el final de la fermentación (4,5-4,3).

En el medio MRS_{Mel} 3,0%, la glucosa y fructosa se consumieron por completo luego de 8 h de incubación mientras que la sacarosa disponible se agotó a las 24 h (Figura 4.3.b). El agotamiento de los azúcares fue más lento cuando se incrementó la concentración de azúcares de melaza (5,0-10,0%, p/v) en el medio de cultivo; los azúcares presentes se agotaron luego de 24 h cuando se usó MRS_{Mel} 5,0% (Figura 4.3.d) mientras que entre el 9-13% de la sacarosa inicial y 53-57% de la glucosa inicial permanecieron sin fermentar en los medios MRS_{Mel} 7,5% y MRS_{Mel} 10,0% después de 48 h (Figuras 4.3.f y 4.3.h).

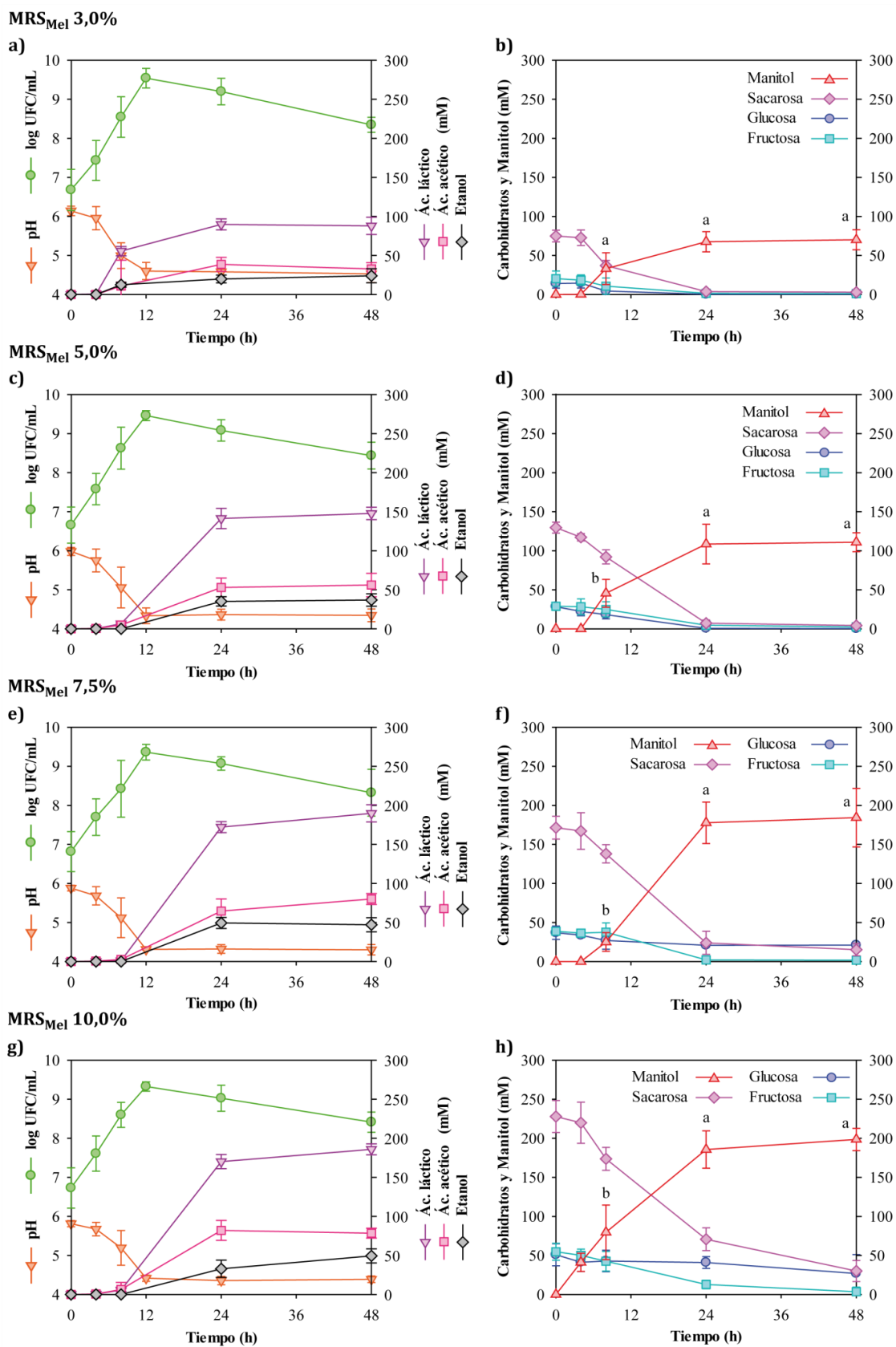


Figura 4.3 Crecimiento celular, consumo de azúcares y formación de productos finales por *L. reuteri* CRL 1101 en medios MRS_{Mel} 3,0% (a-b), MRS_{Mel} 5,0 (c-d); MRS_{Mel} 7,5% (e-f) y MRS_{Mel} 10,0% (g-h) en cultivos estáticos a pH libre a 37 °C durante 48 h. Los valores con letras distintas (a-c) se consideran estadísticamente diferentes ($p > 0,05$).

La glucosa total disponible (libre y proveniente de la hidrólisis de la sacarosa) fue convertida por *L. reuteri* CRL 1101 principalmente en ácido láctico (88-190 mM) y, en menor medida, en ácido acético (33-80 mM) y etanol (24-49 mM) a través de la vía PK (metabolismo heterofermentativo). Se obtuvieron mayores cantidades de ácido láctico al aumentar la concentración de melaza de 3,0 a 10,0% (p/v), mientras que las concentraciones de ácido acético y etanol se mantuvieron relativamente constantes y bajas en todos los medios evaluados (Figura 4.3). La conversión de azúcares en ácidos orgánicos fue más rápida (8 h) en presencia de 3,0% (p/v) de azúcares de melaza (Figura 4.3.a).

En todos los medios evaluados la producción de manitol comenzó entre las 4 y 8 h de fermentación alcanzando valores máximos a las 24 h, siendo las mayores producciones de manitol 178 ± 27 mM (32 ± 5 g/L) y 185 ± 24 mM (34 ± 4 g/L) en presencia de 7,5 y 10,0% de azúcares de melaza, respectivamente (Figuras 4.3.f y 4.3.h, Tabla 4.2). En estas condiciones también se obtuvieron los mayores rendimientos (Y_{Mtl} : 93 y 97%, respectivamente) y productividades volumétricas (1,333 y 1,414 g/L h). Esto indica que la fructosa total consumida (libre y proveniente de la hidrólisis de la sacarosa) fue principalmente utilizada como aceptor alternativo de electrones y reducida a manitol. Al igual que en los medios MRS_{GF} , el incremento en la concentración de azúcares (10,0%) así como en el tiempo de incubación (48 h) no condujo a un aumento significativo en la formación de manitol.

A partir de los resultados obtenidos, se seleccionó la melaza de caña de azúcar como fuente de carbono en una concentración de azúcares totales de 7,5% (p/v) para continuar los estudios de producción de manitol por *L. reuteri* CRL 1101.

4.2.2. Efecto de la temperatura de incubación y la agitación de los cultivos

Para investigar el efecto de la temperatura sobre la formación de manitol por *L. reuteri* CRL 1101, se incubó la cepa en medio MRS_{Mel} 7,5% a 30 °C durante 48 h (Figura 4.4). La disminución de la temperatura de 37 a 30 °C produjo una desaceleración del crecimiento y metabolismo celular. El recuento celular máximo ($9,0 \pm 0,2$ log UFC/mL) y menor valor de pH ($4,3 \pm 0,1$) se alcanzaron a las 48 h, mientras que en los cultivos incubados a 37 °C

se alcanzaron recuentos celulares similares ($9,4 \pm 0,2$ log UFC/mL) a las 12 h de fermentación (Figura 4.3.e).

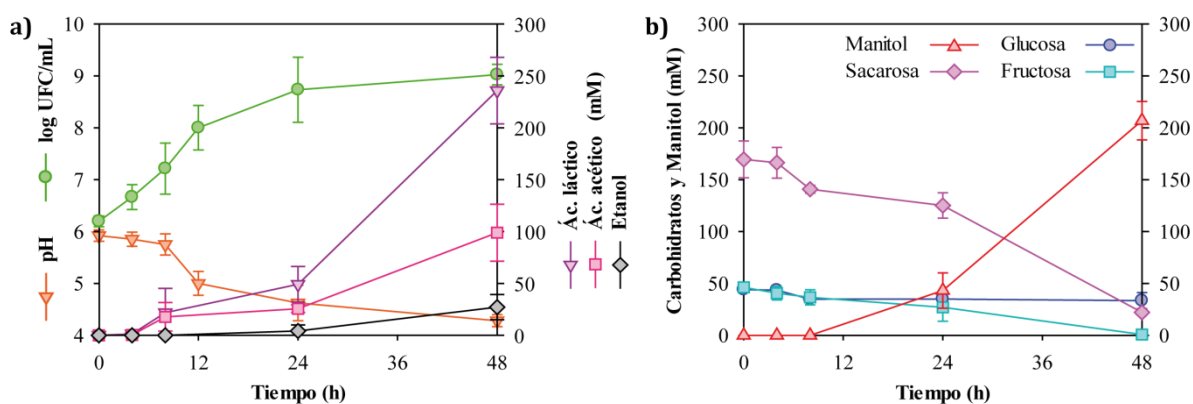


Figura 4.4 Crecimiento celular y formación de productos finales (a), consumo de azúcares y producción de manitol (b) por *L. reuteri* CRL 1101 en medio MRS_{Mel} 7,5% en cultivos estáticos a pH libre incubados a 30 °C durante 48 h.

El consumo de azúcares fue más lento que el observado a 37 °C; el 74% de la cantidad inicial de sacarosa, 79% de la glucosa y 58% de la fructosa libres permanecieron sin fermentar luego de 24 h de incubación (Figura 4.4.b). A las 48 h no se detectó fructosa libre mientras que gran parte de la glucosa libre (76%) y el 13% de la sacarosa inicial permanecieron sin fermentar. La glucosa total consumida fue convertida en ácido láctico, ácido acético y etanol (Figura 4.4.a). La fructosa consumida se utilizó exclusivamente como aceptor alternativo de electrones siendo completamente reducida a manitol produciendo 207 ± 18 mM (38 ± 3 g/L) luego de 48 h con un rendimiento (Y_{Mtl}) del 107%. Esta concentración fue similar a la obtenida a las 24 h cuando la cepa se incubó a 37 °C (Figura 4.3.f).

La influencia de la agitación del cultivo (estrés oxidativo) sobre el crecimiento celular y la producción de manitol se estudió en MRS_{Mel} 7,5% bajo agitación de 100 rpm a 37 °C durante 24 h. En este cultivo el máximo recuento celular ($9,1 \pm 0,4$ log UFC/mL) se obtuvo a las 12 h de incubación (Figura 4.5.a), valor que fue similar al obtenido en el mismo tiempo en cultivo estático ($9,4 \pm 0,2$ log UFC/mL) (Figura 4.3.e). El consumo de los azúcares (sacarosa y fructosa) fue más acelerado que en cultivo estático, a excepción de la glucosa libre cuya concentración no se modificó durante la fermentación. Se observó producción de ácidos orgánicos y etanol a las 4 y 8 h de incubación, respectivamente (Figura 4.5.a) alcanzando valores máximos (ácido láctico: 157 ± 5 mM,

ácido acético: 80 ± 1 mM, etanol: 19 ± 2 mM) a las 8 h de incubación. En este punto, se detectó el consumo del 71% de la sacarosa y 86% de la fructosa libre (Figura 4.4.b) produciéndose el 90% de los ácidos orgánicos y etanol (Figura 4.5.a).

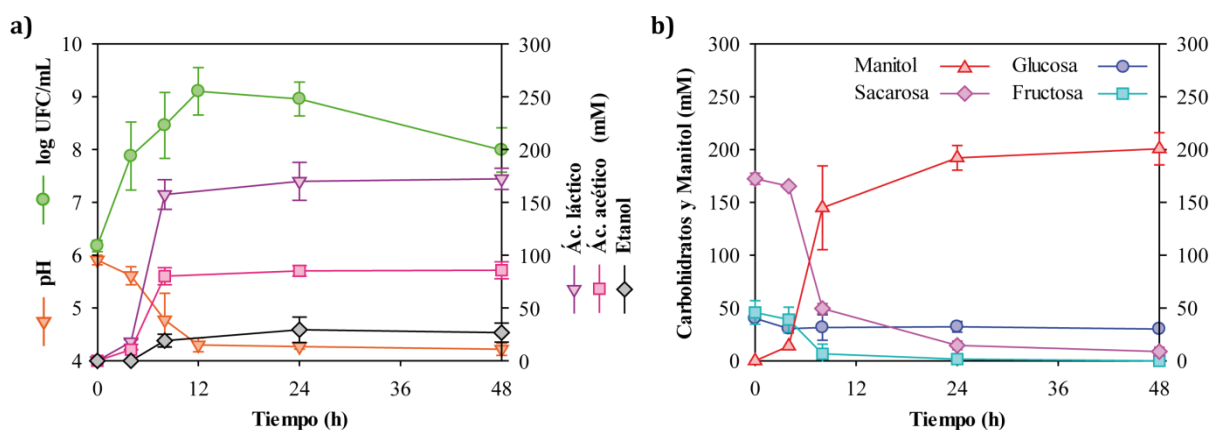


Figura 4.5 Crecimiento celular y formación de productos finales (a), consumo de azúcares y producción de manitol (b) por *L. reuteri* CRL 1101 en medio MRS_{Mel} 7,5% en cultivos agitados (100 rpm) a pH libre incubado a 37 °C durante 48 h.

Si bien se produjo un aumento en la producción de manitol (192 ± 12 mM, 35 ± 2 g/L) en condiciones de agitación, éste no fue estadísticamente significativo con respecto a la producción obtenida en el cultivo estático (178 ± 27 mM, 32 ± 5 g/L) luego de 24 h de incubación (Tabla 4.2 y Figuras 4.5.b y 4.3.f, respectivamente). Los valores de rendimiento y productividad volumétrica también fueron similares. Es interesante notar sin embargo, que a las 8 h de incubación la producción de manitol (145 ± 40 mM, 26 ± 7 g/L) fue 6 veces mayor que la obtenida en cultivos estáticos (25 ± 12 mM, 5 ± 2 g/L).

Tabla 4.2 Consumo de fructosa, producción y rendimiento (Y_{Mtl}) de manitol producido por *L. reuteri* CRL 1101 en medios MRS_{Mel} a las 24 h de incubación bajo distintas condiciones de cultivo.

| Condiciones de cultivo | Consumo de fructosa (mM) | Manitol | | Y_{Mtl} (%) | Q_{Mtl} (g/L h) |
|-------------------------------|--------------------------|----------------|------------|---------------|-------------------|
| | | mM | g/L | | |
| MRS _{Mel} 3,0% 37 °C | 90 ± 11 | 68 ± 10^c | 12 ± 2 | 76 | 0,500 |
| 5,0% 37 °C | 147 ± 9 | 108 ± 25^b | 20 ± 4 | 73 | 0,833 |
| 7,5% 37 °C | 184 ± 17 | 178 ± 27^a | 32 ± 5 | 97 | 1,333 |
| 10,0% 37 °C | 199 ± 12 | 185 ± 24^a | 34 ± 4 | 93 | 1,417 |
| 7,5% 30 °C | 64 ± 12 | 43 ± 17^c | 8 ± 3 | 67 | 0,333 |
| 7,5% 37 °C A | 202 ± 15 | 192 ± 12^a | 35 ± 2 | 95 | 1,458 |

A, agitación (100 rpm)

a-c Valores con letras distintas son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$)

4.2.3. Efecto de la fase de crecimiento y el tiempo de fermentación

Para evaluar la influencia de la fase de crecimiento de *L. reuteri* CRL 1101 en la producción de manitol, se agregó fructosa (5,0%, p/v, concentración final) a cultivos en diferentes fases de crecimiento (lag: 1 h, logarítmica: 6 h y estacionaria: 10 h). Se llevaron a cabo fermentaciones a pH libre a 37 °C en caldo MRS conteniendo glucosa 2,0 % (p/v) (MRS_G). Las fermentaciones se extendieron durante 72 h para evaluar la cinética de consumo de fructosa y producción de manitol, especialmente cuando el azúcar se agregó en cultivos en fase estacionaria.

Cuando *L. reuteri* CRL 1101 creció a expensas de glucosa sin adición de fructosa (MRS_G, control), el máximo recuento celular se alcanzó a las 12 h de incubación ($9,2 \pm 0,2$ log UFC/mL) mostrando un marcado descenso a las 48 h hasta alcanzar valores de $7,1 \pm 0,2$ log UFC/mL al final de la fermentación, lo que representa una disminución de 2,1 unidades logarítmicas (Figura 4.6.a). El pH del medio disminuyó de 6,2 a 4,4 en 12 h.

La adición de fructosa —en fase lag, logarítmica o estacionaria— no produjo un incremento en los valores máximos del recuento celular aunque si permitió mantener la viabilidad constante a lo largo de todo el estudio, obteniendo valores de 8,4-8,5 log UFC/mL a las 72 h (Figuras 4.6.c, e y g) lo que representa una caída de solo 0,7-0,8 unidades logarítmicas. Cabe destacar que, los valores de DO₆₀₀ se mantuvieron inalterables hasta el final de la incubación indicando que no hubo lisis celular durante el proceso de fermentación. En los medios a los que se agregó fructosa se registró una disminución más pronunciada del pH, entre 1,9 y 2,0 unidades de pH.

En todas las condiciones estudiadas, la glucosa se consumió por completo entre las 12 y 24 h de fermentación. En el medio control (MRS_G) solo se detectó producción de ácidos orgánicos, principalmente láctico y, en menor proporción, acético, sin formación de etanol o manitol (Figuras 4.6.a y 4.6.b). Con el agregado de fructosa al medio de cultivo durante las fases lag y logarítmica, a las 24 h se observó un marcado incremento tanto en la producción de manitol (185-160 mM, respectivamente) —por reducción de la fructosa disponible— como en la producción de ácido acético (90-81 mM, respectivamente), mientras que las concentraciones de ácido láctico (149-147 mM,

respectivamente) disminuyeron respecto al control (199 ± 17 mM). Al final de la fermentación, la concentración de ambos ácidos orgánicos fue similar en todos los casos.

Cuando la fructosa se agregó en fase estacionaria se obtuvo un perfil único, sin formación de ácido acético a lo largo de la fermentación y una elevada producción de etanol mostrando valores máximos (117 ± 12 mM) a las 12 h de incubación. Es importante notar que una vez agotada la glucosa, el ácido láctico producido comenzó a consumirse, siendo el caso más notable cuando la fructosa se agregó durante la fase estacionaria, donde se observó un consumo del 57% del ácido láctico entre las 12 h (169 ± 16 mM) y el final de la fermentación (72 h) (72 ± 6 mM). En este período de tiempo también se consumió el 60% del etanol producido (12 h: 117 ± 12 mM; 72 h: 47 ± 4 mM).

La producción de manitol ocurrió entre las 8 y 12 h de fermentación. Las mayores concentraciones de manitol se obtuvieron luego de 24 h cuando se agregó fructosa en la fase lag (185 ± 16 mM, 34 ± 3 g/L) (Figura 4.6.d) y luego de 48 h cuando la fructosa se agregó en fase logarítmica (199 ± 17 mM, 36 ± 3 g/L) (Figura 4.6.f) siendo estos valores muy similares entre sí. Los valores obtenidos a las 72 h de incubación no fueron significativamente mayores en ninguno de estos dos cultivos. La adición de fructosa durante la fase estacionaria resultó en una baja producción de manitol (51 ± 12 mM, 72 h) (Figura 4.6.h). En todos los casos, al finalizar el tiempo de incubación entre el 41 y el 56% de la fructosa inicial permaneció sin fermentar.

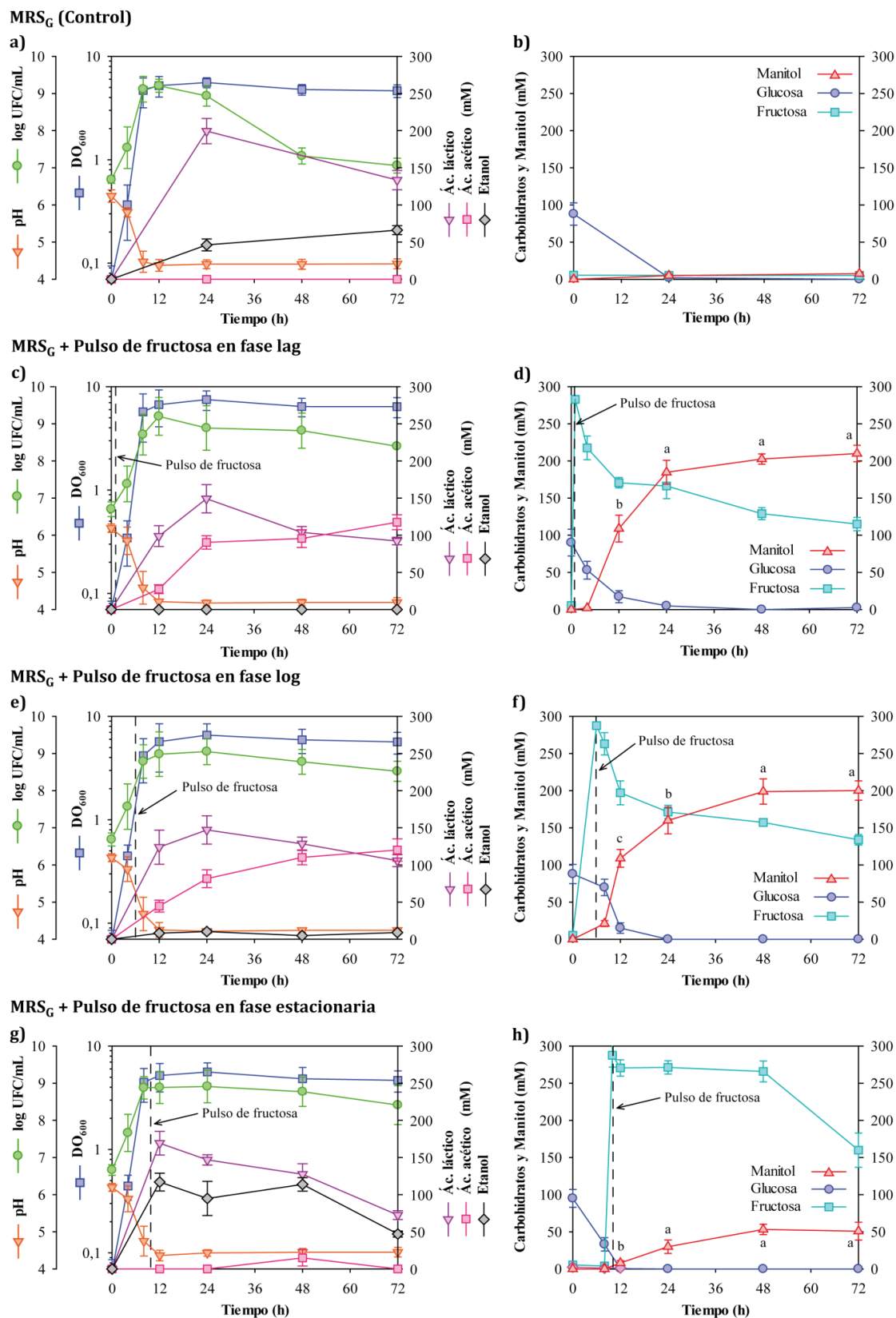


Figura 4.6 Crecimiento celular, formación de productos finales, consumo de azúcares y producción de manitol por *L. reuteri* CRL 1101 en medio MRS_G (a-b, control), con el agregado de fructosa en fase lag (1 h, c-d), logarítmica (6 h, e-f) o estacionaria (10 h, g-h), en cultivos a pH libre incubados a 37 °C durante 72 h. Los valores con letras distintas (a-c) se consideran estadísticamente diferentes ($p > 0,05$).

4.2.4. Actividad manitol 2-deshidrogenasa

Para investigar si existe una correlación entre la producción de manitol y la actividad de la enzima MDH en las condiciones de cultivo ensayadas, se determinó dicha actividad en extractos proteicos intracelulares obtenidos a partir de cultivos crecidos en todos los medios con diferentes tiempos de incubación. Previamente se estudió la afinidad de la enzima MDH por los cofactores NADH y NADPH. Dado que la actividad MDH fue 1,3 veces mayor en presencia de NADPH que de NADH, se estableció que este cofactor era más adecuado para los ensayos de actividad. Los resultados de actividad MDH obtenidos se detallan en la Tabla 4.3.

En general, los valores más elevados de actividad MDH (3,65-2,60 U/mg prot) se encontraron en las fases tempranas de crecimiento (fase lag, 4 h) independientemente de las condiciones de cultivo ensayadas. Cuando la fermentación se llevó a cabo a 30 °C, la actividad máxima se observó entre las 8 y las 24 h de incubación (2,71-2,68 U/mg prot) correspondiendo a la fase logarítmica, debido al crecimiento más lento a esta temperatura en comparación con 37 °C. En todos los casos se detectó una disminución de la actividad MDH a partir de la fase logarítmica tardía. Curiosamente, el valor más alto de actividad ($3,65 \pm 0,05$ U/mg prot) se obtuvo en el medio conteniendo 3,0% (p/v) de azúcares de melaza a pesar de que los valores máximos de producción manitol se obtuvieron a concentraciones superiores (Figura 4.3 y Tabla 4.2). Los resultados obtenidos sugieren que no existe correlación entre la actividad MDH y los valores máximos de producción de manitol en las condiciones de fermentación ensayadas.

Tabla 4.3 Actividad manitol 2-deshidrogenasa en extractos libres de células de *L. reuteri* CRL 1101 crecidos en medios MRS_{Mel} bajo diferentes condiciones de cultivo. Los valores informados representan las medias \pm SD de tres experimentos independientes.

| Condiciones de cultivo | Actividad MDH (U/mg prot) a diferentes tiempos de incubación (h) | | | |
|-------------------------------------|--|-----------------|-----------------|-----------------|
| | 4 | 8 | 24 | 48 |
| MRS_{Mel} 3,0% 37 °C | 3,65 \pm 0,05 | 2,10 \pm 0,10 | 2,34 \pm 0,02 | 2,02 \pm 0,07 |
| 5,0% 37 °C | 2,59 \pm 0,10 | 1,99 \pm 0,26 | 2,12 \pm 0,13 | 1,96 \pm 0,09 |
| 7,5% 37 °C | 2,28 \pm 0,04 | 1,85 \pm 0,14 | 1,73 \pm 0,31 | 1,58 \pm 0,08 |
| 10,0% 37 °C | 2,60 \pm 0,08 | 2,10 \pm 0,66 | 2,09 \pm 0,08 | 1,35 \pm 0,09 |
| 7,5% 30 °C | 0,26 \pm 0,09 | 2,71 \pm 0,65 | 2,68 \pm 0,38 | 1,74 \pm 0,08 |
| 7,5% 37 °C A | 2,06 \pm 0,14 | 1,04 \pm 0,32 | 1,08 \pm 0,29 | 0,58 \pm 0,17 |

A, cultivo agitado (100 rpm)

4.3. Discusión

El manitol presenta múltiples aplicaciones en las industrias de los alimentos, farmacéutica y química y en medicina. Actualmente, este poliol se produce a nivel industrial empleando un proceso químico de baja eficiencia que utiliza jarabes de glucosa y fructosa como sustratos de partida produciéndose manitol con la formación simultánea de sorbitol. En los últimos 15 años se buscaron otras alternativas para producir manitol de una forma más eficiente. De esta manera surgió la posibilidad de utilizar BL productoras de manitol para ser aplicadas en procesos biotecnológicos. En este capítulo se presentaron los estudios sobre la producción de manitol por *L. reuteri* CRL 1101 a partir de diversos tipos de fuentes de carbono, incluyendo melaza de caña de azúcar —un subproducto de la industria azucarera— como fuente de carbono de bajo costo, usando diferentes concentraciones de azúcares totales.

L. reuteri CRL 1101 fue capaz de crecer en presencia de glucosa, mezclas de glucosa y fructosa y melaza de caña de azúcar, utilizando la fructosa como un aceptor alternativo de electrones y reduciéndola a manitol desde el inicio de la fermentación. Cabe destacar que en los medios MRS_G con pulsos de fructosa en diferentes fases de crecimiento, se observó el agotamiento de la glucosa entre las 8 y 12 h de incubación; a partir de ese momento *L. reuteri* CRL 1101 comenzó a consumir el ácido láctico producido inicialmente convirtiéndolo en ácido acético. Aunque las BL deben su nombre a su capacidad para producir ácido láctico, está bien documentado que muchas de ellas son capaces también de degradarlo, tanto bajo condiciones aeróbicas —utilizando el oxígeno como un aceptor de electrones— como anaeróbicas, utilizando diferentes cofactores y produciendo una variedad de productos finales (Murphy y col., 1985; Lindgren y col., 1990; Bobillo y Marshall, 1991; Oude Elferink y col., 2001; Quatravaux y col., 2006; Johanningsmeier y col., 2012). En este sentido se propuso que la reoxidación del lactato a acetato se lleva a cabo a través de piruvato como metabolito intermediario. La conversión de lactato a piruvato es catalizada por la lactato deshidrogenasa (Veiga-da-Cunha y Foster, 1992) y luego el piruvato es convertido a acetato por acción de una piruvato oxidasa, reacción acoplada a la producción de ATP (Lorquet y col., 2004). Por otro lado se propuso otra vía de degradación de ácido láctico que estaría presente en *L.*

buchneri y especies relacionadas, donde 2 moles de ácido láctico son degradados a 1 mol de ácido acético y 1 mol de 1,2-propanediol (Oude Elferink y col., 2001). Esta acumulación de acetato en lugar de lactato tiene un efecto beneficioso para la célula ya que posibilita la biosíntesis de ATP adicional y permite la sobrevivencia del microorganismo durante la fase estacionaria después del agotamiento de la glucosa.

Se sabe que ciertas bacterias, como *Pseu. putida* S12, producen manitol en respuesta a elevadas concentraciones de azúcares (estrés osmótico) dado que este compuesto puede actuar como osmolito (Kets y col., 1996). El manitol también fue descrito como un agente osmoprotector en levaduras (Shen y col., 1999), plantas (Shen y col., 1997), algas y hongos (Yancey y col., 1982). En esta Tesis se evaluaron diferentes tipos y concentraciones de fuentes de carbono, a fin de dilucidar si la producción de manitol era favorecida en presencia de elevadas concentraciones de azúcares. *L. reuteri* CRL 1101 produce eficientemente manitol con valores superiores a 192 mM (35 g/L) y un rendimiento del 95% cuando crece en caldo MRS sin glucosa suplementado con 7,5% (p/v) de azúcares de melaza (MRS_{Mel} 7,5%) bajo agitación (100 rpm) a 37 °C durante 24 h. Otros sustratos de bajo costo han sido investigados para la producción de manitol. Carvalheiro y col. (2011) utilizaron jarabe de algarroba para la síntesis de este poliol por diferentes cepas de *Lactobacillus* y *Leuconostoc*. Este sustrato contiene sacarosa, fructosa, glucosa y pinitol en una concentración de azúcares totales de 92 g/L. Las mayores concentraciones de manitol se lograron con *L. reuteri* DSM 20016 y *Leuc. fructosum* NRRL B-2041, alcanzando valores de 38 y 44 g/L, respectivamente, después de 24 h de incubación a 37 °C. Saha (2006b) evaluó el uso de la melaza de caña de azúcar sola y en combinación con jarabe de fructosa en una relación 1:1 (fructosa:glucosa 4:1) para la producción de manitol por *L. intermedius* NRRL B-3693 en cultivos agitados a pH controlado de 5,0. En presencia de una concentración muy alta de azúcares totales de melaza (150 g/L), esta cepa produjo una cantidad máxima de manitol de 40 g/L después de 40 h de incubación, mientras que a partir de la mezcla de melaza y jarabe de fructosa se obtuvo un valor 2,6 veces mayor (104 g/L) a las 16 h de incubación.

En el presente trabajo de Tesis el aumento en la concentración de azúcares de melaza de 7,5 a 10,0% (p/v) no mejoró la producción de manitol por *L. reuteri* CRL 1101. En este

sentido, Yun y Kim (1998) encontraron que las cepas de *Lactobacillus sp.* Y-107 y *Leuconostoc sp.* Y-002 no fueron capaces de utilizar concentraciones de azúcares superiores a 100 g/L debido a la baja osmotolerancia de estas bacterias. Por otra parte, el aumento de la concentración inicial de fructosa de 100 a 120-140 g/L resultó en una disminución de la productividad de manitol por la cepa *Leuc. mesenteroides* ATCC 9135 debido a la inhibición de la enzima MDH, tanto por sustrato como por producto final (von Weymarn, 2002). Para investigar la función del manitol durante el estrés osmótico en levaduras, se construyó la cepa mutante de *S. cerevisiae* BWG1-7A denominada *osg1-1*, defectuosa en la producción de glicerol y, por lo tanto, osmosensible. Esta cepa mutante y la cepa de tipo salvaje se transformaron con un plásmido conteniendo el gen que codifica para la manitol-1-fosfato deshidrogenasa de *E. coli*. Ambas transformantes fueron capaces de producir manitol. Aunque la síntesis de manitol no tuvo efectos fenotípicos en la cepa de tipo salvaje, sí provocó un efecto notable en la cepa mutante *osg1-1*, restaurando su capacidad para crecer en presencia de altas concentraciones de NaCl (Chaturvedy y col., 1997).

Para aumentar la producción de manitol por *L. reuteri* CRL 1101 se investigaron diferentes condiciones de cultivo. La reducción de la temperatura de incubación de 37 °C a 30 °C desaceleró el crecimiento celular percibiéndose una menor producción de ácidos orgánicos y manitol; solo después de 48 h de incubación la cantidad de manitol producido fue similar a la obtenida cuando la cepa se incubó a 37 °C durante 24 h. von Weymarn (2002) estudió la producción de manitol por ocho especies de BL heterofermentativas y encontró que la capacidad para producir manitol a partir de fructosa varía marcadamente entre las especies. El rendimiento de la producción de manitol por *L. fermentum* NRRL B-1932 aumentó de 86 a 94% cuando la temperatura se incrementó a 25 a 35 °C usando fructosa y glucosa como fuentes de carbono y energía en una relación 2:1.

Se ha demostrado que la síntesis de manitol en ciertos hongos como *Uromyces (U.) fabae* se produce como respuesta al estrés oxidativo, ya que este poliol puede actuar como depurador de las especies reactivas del oxígeno (Voegele y col., 2005). Esta capacidad fue descrita hace décadas por Smirnoff y Cumbes (1989) quienes postularon que el

manitol era un depurador eficaz de radicales hidroxilo. La acción protectora de este poliol también se demostró en *Lc. lactis*: agregando manitol al *buffer* de secado de estas células se obtuvo una mayor supervivencia celular luego del secado y la rehidratación, en comparación con el tratamiento con *buffer* sin manitol. Se planteó que estas observaciones podrían explicarse, en parte, por la acción depuradora de radicales ejercida por el manitol (Efiuvwevwere y col., 1999).

Para evaluar si el estrés oxidativo producido por la agitación de los cultivos (mayor cantidad de oxígeno disuelto) favorecía la producción de manitol, se aplicó una agitación de 100 rpm a cultivos crecidos en MRS conteniendo 7,5% (p/v) de azúcares totales de melaza (MRS_{Mel} 7,5%) incubado a 37 °C durante 24 h. La formación de manitol fue similar en cultivos aireados y estáticos después de 24 h de incubación; sin embargo, el resultado más notable fue la producción de elevadas concentraciones de manitol (145 mM) durante la fase logarítmica de crecimiento (8 h de incubación), valor 6 veces superior al obtenido en cultivos estáticos en el mismo tiempo. En cultivos agitados y luego de 24 h, *L. reuteri* CRL 1101 produjo cantidades de manitol (35 ± 2 g/L) similares a las obtenidas por Saha (2006b) (40,4 g/L) luego de 40 h cuando utilizó melaza como única fuente de carbono. Cabe destacar que a diferencia de lo realizado en el presente trabajo de Tesis, Saha empleó una concentración de azúcares de melaza mayor (15%) y un período de fermentación de 40 h en lugar de 24 h. Teniendo en cuenta que *L. reuteri* CRL 1101 floclula al entrar en fase estacionaria, estos resultados nos permiten sugerir que la agitación suave (100 rpm) y constante evitaría la floclulación de las células favoreciendo el contacto células-nutrientes y, en consecuencia, el crecimiento bacteriano y la producción de manitol.

Cuando se evaluó la respuesta a estrés osmótico u oxidativo en otros microorganismos, las concentraciones de manitol producidas fueron muy bajas, siendo los máximos valores encontrados 258 μ moles/g de células (peso seco) de *Pseu. putida* S12 (Kets y col., 1996), 5,5 mM (1 g/L) en extractos intracelulares de *U. fabae* (Voegele y col., 2005) y entre 20 y 44 μ g/mL en extractos intracelulares de la mutante *osg1-1* de *S. cerevisiae* BWG1-7A (Chaturvedy y col., 1997). Por otra parte, estos microorganismos no secretan al medio extracelular el manitol producido. Por el contrario, las BL heterofermentativas

producen grandes cantidades de manitol a partir de fructosa y lo secretan al medio externo, por lo que la producción de manitol en BL no estaría relacionada al estrés osmótico u oxidativo sino más bien a la ganancia de ATP y la regeneración del poder reductor.

Se investigó la actividad MDH durante el crecimiento de *L. reuteri* CRL 1101 en todas las condiciones de fermentación estudiadas para evaluar la correlación entre la actividad enzimática y la producción de manitol. A la fecha, existen escasos trabajos publicados sobre la caracterización y purificación de la enzima MDH en BL heterofermentativas (Hahn y col., 2003; Korakli y Vogel, 2003; Saha, 2004; Sasaki y col., 2005). No existen a la fecha trabajos que determinen la actividad MDH en función del crecimiento celular ni bajo diferentes condiciones de fermentación, con excepción de este trabajo de Tesis. Los valores de actividad MDH obtenidos aquí fueron, en general, más altos ($3,65 \pm 0,05$ U/mg prot) en comparación con los informados por Saha (2004) y Korakli y Vogel (2003), quienes encontraron valores de actividad MDH de 1 U/mg prot en extractos crudos de *L. intermedius* NRRL B-3693 y diferentes cepas de *L. sanfranciscensis* crecidas en MRS suplementado con sacarosa y fructosa, respectivamente. En nuestros ensayos, los valores más altos de actividad MDH se obtuvieron durante la fase logarítmica de crecimiento en todas las condiciones evaluadas, lo que coincide con la elevada tasa de formación de manitol durante las fases logarítmica y estacionaria temprana e indica que la producción de manitol está asociada al crecimiento celular (Rodríguez y col., 2012). En este sentido, la máxima actividad MDH coincide con las primeras fases de crecimiento durante las cuales se produce un incremento sostenido en la producción de manitol. En contraste, los valores máximos de producción de manitol (192 ± 12 mM) por *L. reuteri* CRL 1101 obtenidos en medio MRS_{Mel} 7,5% a las 24 h de incubación no se correlacionaron con la mayor actividad MDH ($3,65 \pm 0,05$ U/mg prot) detectada en medio MRS_{Mel} 3,0% a las 4 h de incubación. Para comprender mejor este fenómeno, se requieren estudios adicionales de expresión del gen *mdh* en diferentes condiciones de cultivo que podría relacionarse con la síntesis de la enzima más que con la actividad de la misma.

4.4. Conclusiones Parciales

En el presente capítulo se estudió la influencia de diversas condiciones de cultivo en la síntesis de manitol por *L. reuteri* CRL 1011. Luego del análisis de los resultados obtenidos se llegó a las siguientes conclusiones parciales:

- La producción de manitol por *L. reuteri* CRL 1101 está asociada al crecimiento bacteriano (metabolito primario). Ésta se evidenció desde el inicio de la fermentación (4 h) hasta las 24 h; la prolongación de la fermentación hasta las 48 o 72 h no produjo aumentos significativos en la síntesis de manitol.
- Para favorecer la formación de manitol, la fructosa debe estar disponible desde el inicio de la fermentación.
- La melaza de caña de azúcar es un sustrato adecuado para la producción de manitol por *L. reuteri* CRL 1101.
- La agitación de los cultivos aceleró la producción de manitol durante las primeras horas de fermentación, alcanzando a las 8 h un valor 6 veces mayor ($145 \pm 40 \text{ mM} = 26 \pm 7 \text{ g/L}$) que el obtenido en cultivos estáticos ($25 \pm 12 \text{ mM} = 5 \pm 2 \text{ g/L}$).
- La máxima concentración de manitol fue $192 \pm 12 \text{ mM}$ ($35 \pm 2 \text{ g/L}$) y se obtuvo con 7,5% de azúcares de melaza bajo condiciones de agitación. El incremento en la concentración de azúcares no produjo aumentos significativos en la producción de manitol.
- Hasta el momento, las condiciones de cultivo óptimas de producción de manitol por *L. reuteri* CRL 1101 son: MRS suplementado con melaza de caña de azúcar (7,5% de azúcares totales) como fuente de carbono, bajo agitación suave (100 rpm) incubado a 37 °C durante 24 h.

CAPÍTULO II: PRODUCCIÓN DE MANITOL POR *Lactobacillus reuteri* CRL 1101 EN UN MEDIO DE CULTIVO MINIMIZADO

5.1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de un proceso biotecnológico eficiente y competitivo para la producción de un compuesto de interés involucra, entre otros aspectos, la optimización de las condiciones de cultivo y la elaboración de medios de cultivo de bajo costo. En este Capítulo se describen los estudios realizados para la formulación de un medio de cultivo minimizado para la producción de manitol por *L. reuteri* CRL 1101 y la optimización de las condiciones de producción usando dicho medio.

La optimización de un medio de cultivo, en algunos casos solo apunta al desarrollo de un medio de producción, es decir que simplemente asegure la óptima producción del compuesto de interés, mientras que en otros casos el medio debe ser adecuado tanto para el crecimiento celular como para la producción del metabolito diana, lo que constituye un desafío aún mayor. La optimización de medios de cultivos para BL utilizando fuentes alternativas de carbono y/o nitrógeno para la producción de metabolitos de interés industrial fue objeto de varios estudios. Se han formulado diversos medios minimizados para la producción de ácido láctico por BL. Entre ellos podemos nombrar la síntesis de ácido láctico por diferentes cepas: i) *L. amylophilus* GV6 en un medio conteniendo almidón y harina de lentejas (Altaf y col, 2007), ii) una cepa de *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* aislada de yogur en un medio conteniendo melaza de caña de azúcar (Farooq y col., 2012) y iii) *Leuc. mesenteroides* B512 usando melaza de caña y un lisado de levaduras como fuente de carbono y nitrógeno, respectivamente (Fontes Coelho y col., 2011). Dos estudios recientes evaluaron medios de cultivo con peptona de

soja como fuente de nitrógeno para la producción de bacteriocinas por las cepas *L. plantarum* YJG (Han y col., 2011) y *L. pentosus* SJ65 (Saraniya y Jeevaratnam, 2014).

Por otro lado, se llevaron a cabo estudios de optimización del medio de cultivo para la formación de biomasa usando jarabe de maíz y urea como fuentes de carbono y nitrógeno de bajo costo para el crecimiento de una cepa de *L. fermentum* con potencial probiótico aislada de intestino de cerdo (Gao y col., 2009). Otro ejemplo del uso de sustratos económicos fue la utilización de extracto de malta para el crecimiento de *L. plantarum* VTT E-79098, microorganismo usado para mejorar la estabilidad microbiológica, la calidad y la seguridad de ensilados (Laitila y col., 2004). En un estudio más reciente se formularon medios de cultivo conteniendo harina de semillas de poroto, lenteja, garbanzo, maní y trigo como fuente de nitrógeno vegetal para el crecimiento de una cepa probiótica de *L. lactis* (Pathak y Martirosyan, 2012).

En el capítulo I se describió que *L. reuteri* CRL 1101 es capaz de crecer y producir manitol en un medio de cultivo rico conteniendo melaza de caña de azúcar como fuente de carbono en fermentaciones a pH libre durante 24 h. Para formular un medio de cultivo minimizado, y por lo tanto de menor costo, que asegure el crecimiento celular y la formación de manitol por la cepa en estudio, se requiere el reemplazo o eliminación de algunos componentes del caldo MRS. Los principales objetivos de esta etapa del trabajo de Tesis fueron i) formular un medio de cultivo minimizado conteniendo melaza de caña de azúcar como fuente de carbono para el crecimiento de *L. reuteri* CRL 1101 y la producción eficiente de manitol, ii) determinar el pH óptimo para la formación del polirol y iii) evaluar el efecto de la biomasa inicial en la producción de manitol. Este estudio comprende la evaluación de los requerimientos nutricionales tanto para el crecimiento celular como para la formación del polirol.

5.2. RESULTADOS

Tal como se vio en el capítulo anterior, la producción de manitol por *L. reuteri* CRL 1101 estuvo asociada al crecimiento celular. Es por ello que para la formulación de un medio de cultivo minimizado para la producción del polirol también se debe lograr que dicho medio permita el crecimiento óptimo del microorganismo.

5.2.1. Formulación de un medio de cultivo minimizado para la producción de manitol por *L. reuteri* CRL 1101

5.2.1.a. Efecto de sales presentes en el caldo MRS sobre el crecimiento celular

Se evaluó el efecto de la presencia y ausencia de cada una de las sales que componen el caldo MRS, sobre el crecimiento de *L. reuteri* CRL 1101 utilizando medios MRS modificados. Se realizaron fermentaciones a pH libre a 37 °C durante 24 h. En la Figura 5.1 se muestran los resultados obtenidos en los distintos medios.

La ausencia de sulfato de manganeso disminuyó el crecimiento de *L. reuteri* CRL 1101, obteniéndose una DO_{600} de $2,03 \pm 0,39$ a las 8 h y de $4,11 \pm 0,91$ a las 24 h de incubación, en comparación con el control (MRS: $3,18 \pm 0,46$ y $5,96 \pm 1,26$ a las 8 y 24 h, respectivamente) (Figura 5.1.a). Además, la velocidad específica de crecimiento (μ_{max}) fue la más baja ($0,42 \pm 0,05 \text{ h}^{-1}$) en ausencia de esta sal en comparación con los medios restantes ($0,49 - 0,55 \text{ h}^{-1}$). El agregado de sulfato de manganeso al caldo MRS sin sales (control negativo) permitió alcanzar mayor crecimiento celular a las 8 y 24 h (DO_{600} : $2,55 \pm 0,74$ y $6,05 \pm 0,81$, respectivamente) (Figura 5.1.b) como así también mayor μ_{max} ($0,46 \pm 0,04 \text{ h}^{-1}$). Estos resultados sugieren que el sulfato de manganeso sería la única sal esencial para el crecimiento de *L. reuteri* CRL 1101.

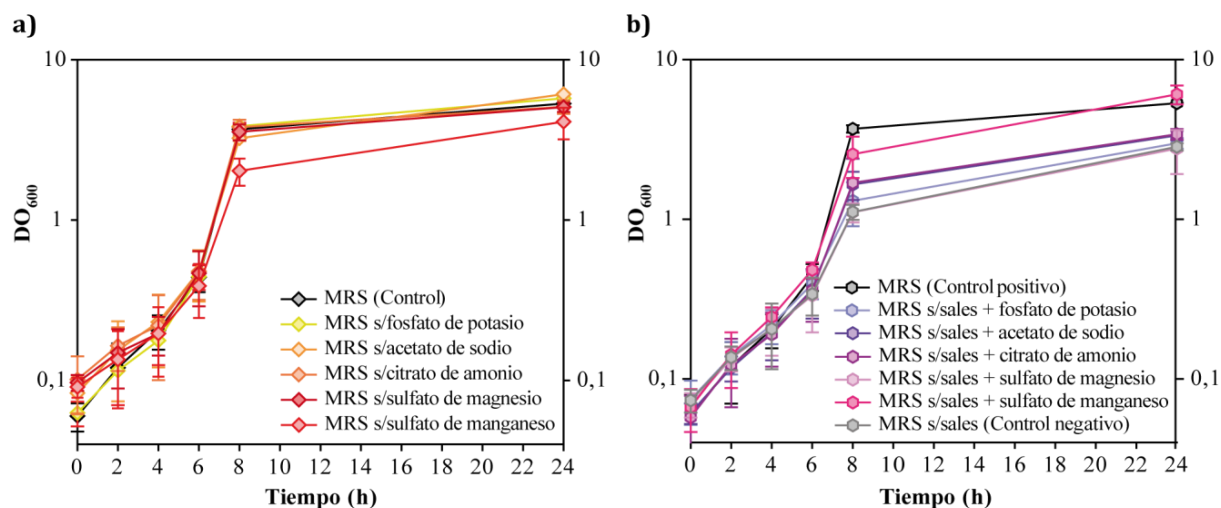


Figura 5.1 Cinética de crecimiento de *L. reuteri* CRL 1101 en medios MRS modificados incubados a 37 °C a pH libre durante 24 h; a) Medios MRS en ausencia de cada una de las sales que lo componen; b) Medios MRS en presencia de cada sal en ausencia de las demás.

5.2.1.b. Crecimiento de *L. reuteri* CRL 1101 en medios minimizados conteniendo glucosa como fuente de carbono

Con el propósito de estudiar el crecimiento celular de *L. reuteri* CRL 1101 en medios minimizados, se llevaron a cabo fermentaciones a pH libre durante 24 h en los medios de cultivo A_G-D_G' formulados con diferentes combinaciones de los componentes del caldo MRS necesarios para asegurar el crecimiento: i) glucosa como fuente de carbono; ii) extracto de levadura como fuente de vitaminas; iii) diferentes fuentes de nitrógeno tales como peptona de carne, peptona de soja o extracto de carne y iv) sulfato de manganeso, en las concentraciones en las que se encuentran en el caldo MRS (Tabla 5.1).

L. reuteri CRL 1101 alcanzó el mayor crecimiento celular (DO_{600} : $4,67 \pm 0,10$) a las 24 h de incubación en el medio D_G' conteniendo glucosa, extracto de levadura, extracto de carne, y sulfato de manganeso. Curiosamente, este es el único medio en el que la cepa alcanzó, luego de 8 h de incubación, un valor de DO_{600} igual a $1,16 \pm 0,31$, mucho mayor que el resto y una μ_{max} de $0,44 \pm 0,14 \text{ h}^{-1}$ similar a la del control ($0,65 \pm 0,15 \text{ h}^{-1}$).

Tabla 5.1 Crecimiento celular (DO_{600} y μ_{max}) de *L. reuteri* CRL 1101 cultivado en medios minimizados conteniendo glucosa, a pH libre y 37 °C a las 24 h de incubación. Los valores informados representan la media \pm SD.

| Medio de cultivo | Componentes | DO_{600} | | μ_{max} (h^{-1}) |
|-------------------------|---|-----------------|-----------------|-----------------------------|
| | | 8 h | 24 h | |
| MRS _{Mel} 7,5% | MRS sin glucosa suplementado con melaza 7,5% | 3,18 \pm 0,46 | 5,96 \pm 1,26 | 0,65 \pm 0,15 |
| A _G | Glucosa, Extracto de levadura | 0,20 \pm 0,03 | 0,41 \pm 0,08 | 0,11 \pm 0,08 |
| A _G ' | Glucosa, Extracto de levadura, MnSO ₄ | 0,16 \pm 0,03 | 0,17 \pm 0,02 | 0,21 \pm 0,09 |
| B _G | Glucosa, Extracto de levadura, Peptona de carne | 0,23 \pm 0,02 | 0,51 \pm 0,11 | 0,09 \pm 0,07 |
| B _G ' | Glucosa, Extracto de levadura, Peptona de carne, MnSO ₄ | 0,43 \pm 0,12 | 4,66 \pm 0,40 | 0,28 \pm 0,19 |
| C _G | Glucosa, Extracto de levadura, Peptona de soja | 0,40 \pm 0,04 | 1,44 \pm 0,06 | 0,29 \pm 0,21 |
| C _G ' | Glucosa, Extracto de levadura, Peptona de soja, MnSO ₄ | 0,27 \pm 0,09 | 2,32 \pm 0,30 | 0,12 \pm 0,10 |
| D _G | Glucosa, Extracto de levadura, Extracto de carne | 0,39 \pm 0,13 | 0,94 \pm 0,11 | 0,29 \pm 0,12 |
| D _G ' | Glucosa, Extracto de levadura, Extracto de carne, MnSO ₄ | 1,16 \pm 0,31 | 4,67 \pm 0,10 | 0,44 \pm 0,14 |

5.2.1.c. Crecimiento y producción de manitol por *L. reuteri* CRL 1101 en medios minimizados conteniendo melaza de caña de azúcar como fuente de carbono

A partir de los resultados obtenidos en el Capítulo I se determinó que la melaza de caña de azúcar es una fuente de carbono adecuada para la síntesis de manitol por la cepa en estudio. Es por ello que, para evaluar la producción de manitol en medios minimizados, se reemplazó la glucosa por azúcares de melaza (7,5%, p/v, concentración final) como fuente de carbono en todos los medios minimizados (A_M-D_M') manteniendo invariables las concentraciones del resto de los componentes (Tabla 5.2). Se llevaron a cabo fermentaciones a pH libre a 37 °C durante 24 h y se evaluó el crecimiento microbiano (recuento celular y μ_{max}), el consumo de fructosa y la producción y rendimiento de manitol. Se utilizó como control positivo MRS_{Mel} 7,5%.

La viabilidad celular final alcanzada en los medios minimizados D_M y D_M' (8,8 \pm 0,1 y 8,9 \pm 0,1 log UFC/mL, respectivamente) fueron similares a la obtenida en el control (9,1 \pm 0,1 log UFC/mL) (Tabla 5.2) luego de 24 h en fermentaciones a 37 °C y pH libre. La mayor velocidad específica de crecimiento se obtuvo en el medio D_M (0,85 \pm 0,02 h⁻¹) similar a la obtenida en el control (0,87 \pm 0,09 h⁻¹). Curiosamente, la ausencia de sulfato de manganeso (Medios B_M, C_M y D_M) no afectó el crecimiento celular cuando se utilizó melaza como fuente de carbono. Por otro lado, la ausencia de alguna fuente de nitrógeno

(A_M y A_{M'}) fue perjudicial para el crecimiento celular y, por consiguiente, para la producción de manitol por *L. reuteri* CRL 1101.

La mayor concentración de manitol fue de 148 ± 7 mM (27 ± 1 g/L) y se obtuvo en el medio D_M a las 24 h de incubación. La adición de sulfato de manganeso a este medio (D_{M'}) no produjo un incremento significativo en la síntesis de manitol. Durante este tiempo se consumió una cantidad equivalente de fructosa (151 ± 13 mM) indicando que este azúcar se utilizó exclusivamente como aceptor alternativo de electrones para la producción del polirol, resultando en un rendimiento (Y_{Mtl}) del 98%. Si bien este valor de producción de manitol es estadísticamente menor que la observada en el medio control (184 ± 10 mM = 34 ± 2 g/L, 92%) y representa un 79% de su valor, se consideró como un resultado promisorio y se seleccionó el medio D_M para estudios posteriores. En adelante se usará la sigla MLC (Melaza, extracto de Levadura y extracto de Carne) para nombrar el medio D_M.

Tabla 5.2. Viabilidad celular, consumo de fructosa, producción y rendimiento de manitol por *L. reuteri* CRL 1101 cultivado en medios minimizados conteniendo melaza, a pH libre a las 24 h de incubación. Los valores informados representan la media ± SD.

| Medio de cultivo | Componentes | Viabilidad celular (log UFC/mL) | μ _{max} (h ⁻¹) | Consumo de fructosa (mM) | Manitol (mM) | Y _{Mtl} (%) |
|-------------------------|--|---------------------------------|-------------------------------------|--------------------------|------------------------|----------------------|
| MRS _{Mel} 7,5% | MRS sin glucosa suplementado con melaza 7,5% | 9,1 ± 0,1 | 0,87 ± 0,09 | 201 ± 20 | 184 ± 10 ^a | 92 |
| A _M | Melaza, Extracto de levadura | 7,3 ± 0,1 | 0,12 ± 0,06 | 7 ± 1 | 0,6 ± 0,4 ^c | 8 |
| A _{M'} | Melaza, Extracto de levadura, MnSO ₄ | 7,3 ± 0,2 | 0,13 ± 0,07 | 7 ± 2 | 0,3 ± 0,3 ^c | 4 |
| B _M | Melaza, Extracto de levadura, Peptona de carne | 8,3 ± 0,6 | 0,59 ± 0,18 | 147 ± 10 | 132 ± 17 ^b | 90 |
| B _{M'} | Melaza, Extracto de levadura, Peptona de carne, MnSO ₄ | 8,4 ± 0,1 | 0,61 ± 0,06 | 106 ± 12 | 124 ± 6 ^b | 118 |
| C _M | Melaza, Extracto de levadura, Peptona de soja | 7,8 ± 0,7 | 0,58 ± 0,10 | 17 ± 2 | 0,5 ± 0,4 ^c | 3 |
| C _{M'} | Melaza, Extracto de levadura, Peptona de soja, MnSO ₄ | 8,1 ± 0,4 | 0,68 ± 0,13 | 15 ± 6 | 0,6 ± 0,1 ^c | 4 |
| D _M | Melaza, Extracto de levadura, Extracto de carne | 8,8 ± 0,1 | 0,85 ± 0,02 | 151 ± 13 | 148 ± 7 ^b | 98 |
| D _{M'} | Melaza, Extracto de levadura, Extracto de carne, MnSO ₄ | 8,9 ± 0,1 | 0,70 ± 0,09 | 145 ± 17 | 138 ± 10 ^b | 95 |

^{a-c} Los valores con letras distintas son significativamente diferentes ($p < 0,05$); las comparaciones entre las condiciones estudiadas se realizaron mediante el análisis de la varianza (*one-way* ANOVA) seguido de la prueba de Tukey HSD.

En la Figura 5.2 se muestran la cinética de crecimiento (log UFC/mL y pH), el consumo de azúcares, la producción de manitol y la formación de productos finales por *L. reuteri* CRL 1101 durante la fermentación a pH libre usando el medio MLC. El crecimiento de la cepa fue óptimo, alcanzando la fase estacionaria a las 8 h de incubación ($8,6 \pm 0,2$ log UFC/mL); a las 24 h se obtuvo un recuento celular final igual a $8,9 \pm 0,1$ log UFC/mL, valor máximo en comparación con el resto de los medios y similar al control ($9,1 \pm 0,1$ log UFC/mL, Tabla 5.2).

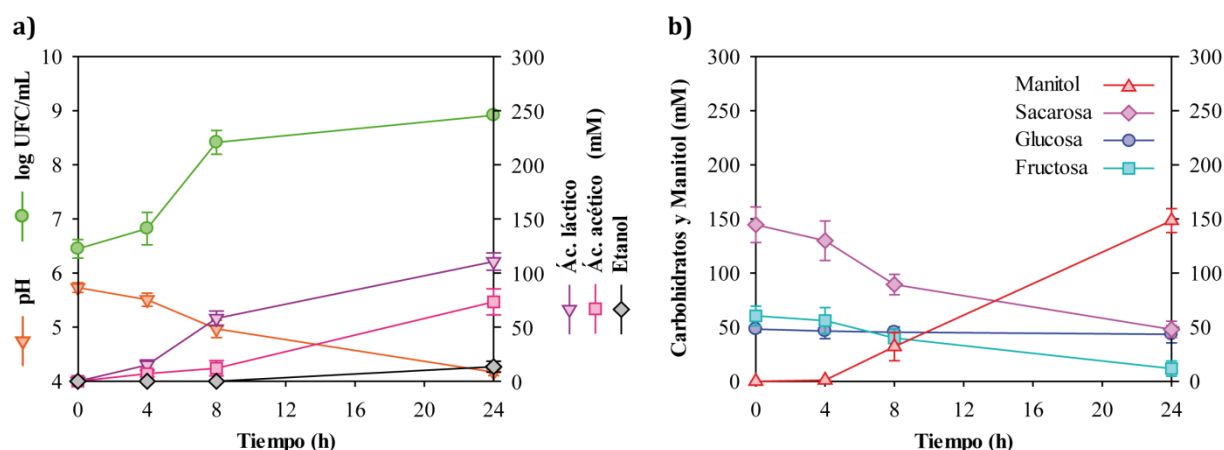


Figura 5.2 Crecimiento celular y perfil de fermentación de *L. reuteri* CRL 1101 en medio MLC a pH libre incubado a 37 °C durante 24 h. a) Cinética de crecimiento y producción de ácidos orgánicos y etanol; b) Consumo de carbohidratos y producción de manitol.

Los carbohidratos presentes en el medio de cultivo no se consumieron completamente durante la fermentación; la concentración de glucosa libre se mantuvo constante hasta finalizar el tiempo de incubación (entre 48 ± 3 mM y 43 ± 4 mM para el período 0-24 h) (Figura 5.2.b). Por el contrario, la concentración de fructosa libre inicial (60 ± 7 mM) disminuyó aproximadamente un 80% luego de 24 h (12 ± 3 mM) mientras que el consumo de sacarosa fue de alrededor del 67% (0 h: 144 ± 16 mM; 24 h: 48 ± 8 mM).

La formación de manitol estuvo asociada al crecimiento celular detectándose a partir de las 4 h de incubación con el consumo simultáneo de sacarosa y fructosa. La máxima concentración del poliol fue de 148 ± 7 mM (27 ± 1 g/L) y se observó a las 24 h de incubación. En este período de tiempo, toda la fructosa consumida (151 ± 13 mM = 27 ± 2 g/L) se redujo a manitol resultando en un rendimiento del 98% e indicando que la fructosa se utilizó exclusivamente como un aceptor alternativo de electrones. La producción de ácido láctico también estuvo asociada al crecimiento celular,

produciéndose 110 ± 6 mM en 24 h (Figura 5.2.a). Este valor resultó ser 44% mayor que la concentración de ácido acético producido en el mismo período de tiempo (73 ± 2 mM) mientras que la producción de etanol fue muy escasa y se hizo evidente recién al final de la fermentación (13 ± 5 mM).

5.2.2. Optimización de la producción de manitol en medio MLC a pH controlado

Para incrementar la producción de manitol, se llevaron a cabo fermentaciones en medio MLC a pH controlado en un rango de pH entre 6,0 y 4,8 (con variaciones de 0,5 unidades de pH) a 37 °C durante 24 h. Se utilizaron como control cultivos crecidos a pH libre en el mismo medio.

Las cinéticas de crecimiento y los patrones de fermentación observados para *L. reuteri* CRL 1101 fueron similares a todas las condiciones de pH controlado (Figuras 5.3 y 5.4). En todos los casos, la fase estacionaria se alcanzó a las 8 h de incubación; los máximos recuentos celulares ($9,0-9,5$ log UFC/mL) se obtuvieron a las 24 h siendo estos valores similares a los obtenidos en el control (pH libre: $8,9 \pm 0,1$ log UFC/mL) (Figura 5.2.a). A diferencia de lo ocurrido en las fermentaciones a pH libre, los azúcares presentes en el medio de cultivo se consumieron por completo luego de 24 h. En todos los casos, el consumo de sacarosa y fructosa libre así como la consiguiente producción de manitol, comenzaron luego de 4 h de incubación. La producción de manitol se incrementó notablemente ($166-228$ mM) en fermentaciones a pH controlado en comparación con los valores obtenidos a pH libre (148 ± 7 mM) (Tabla 5.3).

La disminución del pH desde 6,0 hasta 5,0 indujo a una mayor formación de manitol y a un incremento de los rendimientos. A pH 6,0 y 5,8 (Figuras 5.3.b y d) la fructosa se convirtió parcialmente en manitol; luego de 24 h la cepa utilizó el 77% de la fructosa total consumida (216 ± 8 y 231 ± 12 mM, respectivamente) para la síntesis de manitol (166 ± 8 y 178 ± 5 mM) (Tabla 5.3). El mismo comportamiento se observó a pH 4,8 (Figura 5.4.f). Esta conversión parcial de fructosa en manitol sugiere que la fructosa se utilizó como aceptor de electrones para la producción de manitol y además como sustrato de fermentación para la formación de ácidos orgánicos y etanol. A valores de pH entre 5,6 y 5,0 —y de manera similar a lo ocurrido en fermentaciones a pH libre— la

fructosa total consumida se utilizó principalmente como receptor externo de electrones siendo completamente reducida a manitol, alcanzándose valores de rendimiento de entre 91% (pH 5,4) y 105% (pH 5,0) (Tabla 5.3). El mayor valor de producción de manitol fue 228 ± 6 mM (42 ± 1 g/L) con un rendimiento de 105% y una productividad volumétrica de $1,73 \pm 0,05$ g/L h, obtenidos a pH 5,0 a las 24 h de incubación (Figura 5.4.d, Tabla 5.3).

En cuanto a la producción de ácidos orgánicos y etanol, hubo mayor producción de ácido láctico que de ácido acético a todos los valores de pH evaluados siendo la concentración de ambos ácidos mayor a la de etanol (Tabla 5.3). Las máximas concentraciones de ácidos orgánicos (láctico: 236 ± 14 mM y acético: 127 ± 12 mM) y etanol (95 ± 18 mM) se alcanzaron a pH 5,4 a las 24 h de incubación. La producción de etanol se detectó a partir de las 8 h siendo la concentración entre 4 y 7 veces mayor (51 ± 18 mM a pH 5,6 y 95 ± 18 mM a pH 5,4, respectivamente) al final de la fermentación respecto al control (pH libre: 13 ± 5 mM).

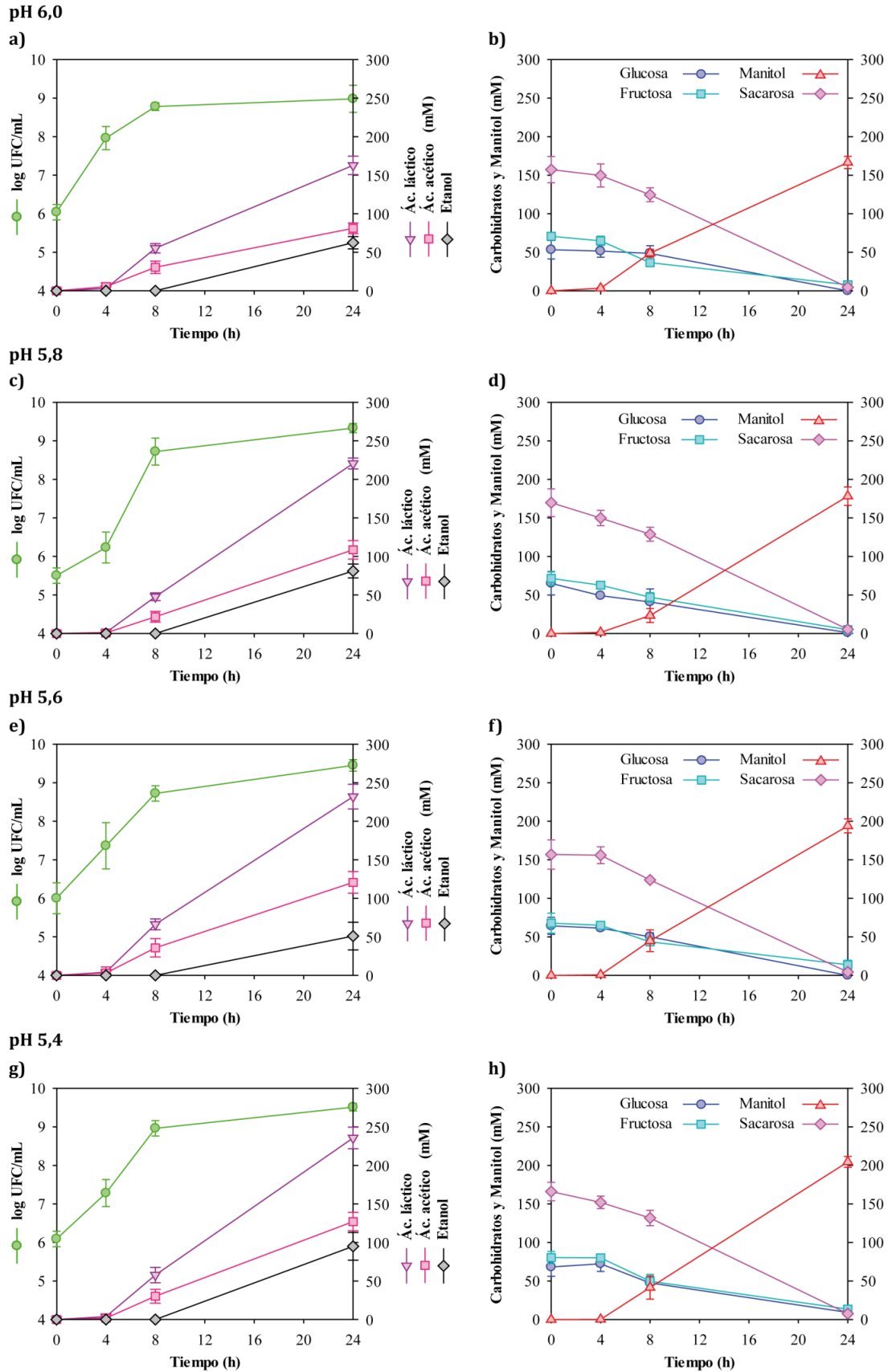


Figura 5.3 Crecimiento y perfiles de fermentación de *L. reuteri* CRL 1101 en medio MLC bajo agitación y pH controlado de 6,0 (a-b); 5,8 (c-d); 5,6 (e-f) y 5,4 (g-h) incubados a 37 °C durante 24 h.

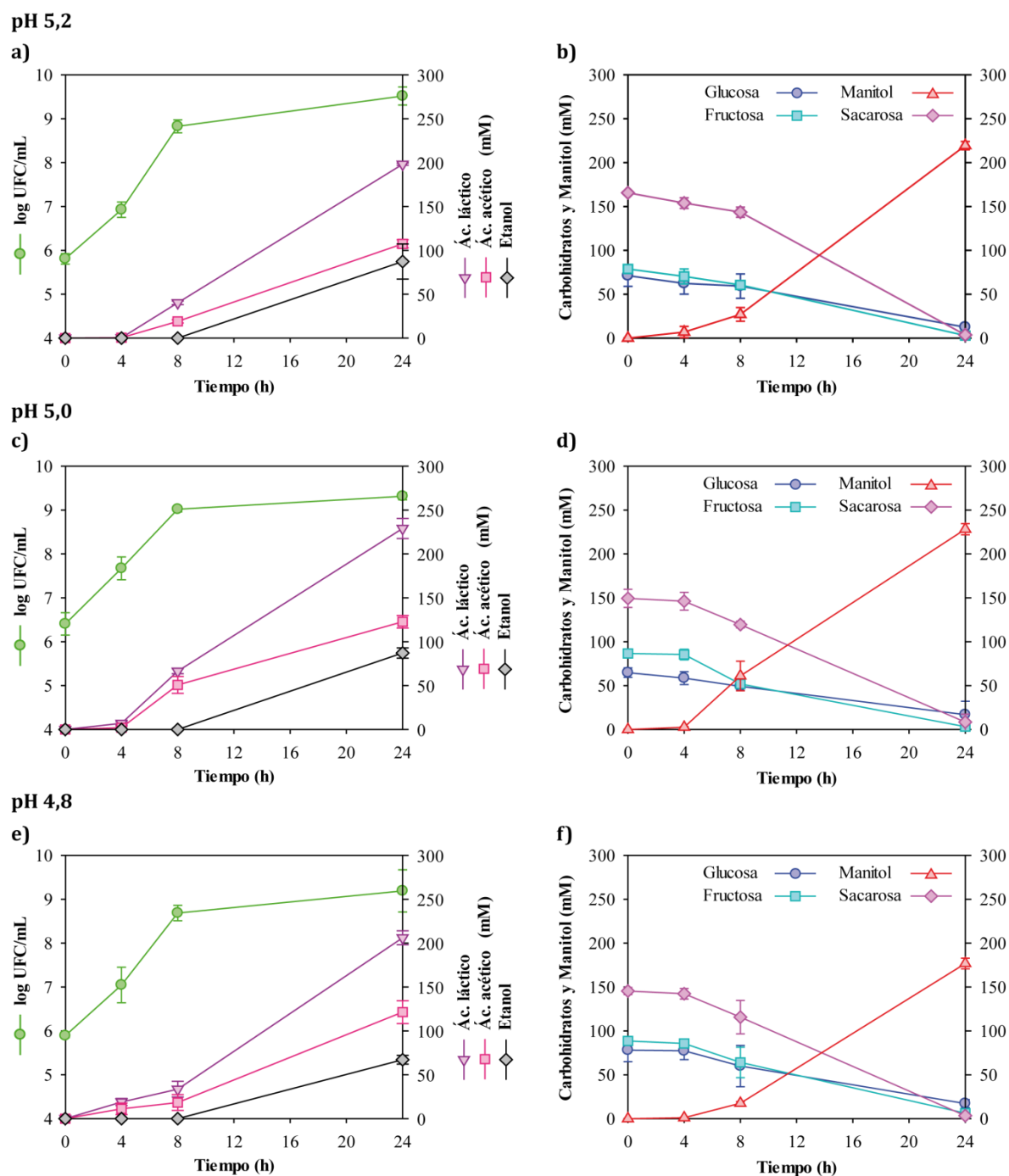


Figura 5.4 Crecimiento y perfiles de fermentación de *L. reuteri* CRL 1101 en medio MLC en cultivos agitados a pH controlado de 5,2 (a-b); 5,0 (c-d) y 4,8 (e-f) incubado a 37 °C durante 24 h.

Tabla 5.3 Viabilidad celular, producción de manitol y ácidos orgánicos por *L. reuteri* CRL 1101 en medio MLC a pH controlado a las 24 h de incubación. Los valores informados representan las medias \pm SD de tres experimentos independientes.

| pH | Viabilidad celular (log UFC/mL) | Ácido láctico (mM) | Ácido acético (mM) | Etanol (mM) | Fructosa total consumida | | Y _{Mdl} (%) | Q _{Mdl} (g/L h) | |
|-----------------|---------------------------------|--------------------|--------------------|-------------|--------------------------|---------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------------|
| | | | | | (mM) | Manitol (g/L) | | | |
| 6,0 | 9,0 \pm 0,1 | 163 \pm 6 | 81 \pm 7 | 62 \pm 8 | 216 \pm 8 | 166 \pm 8 | 30 \pm 2 ^{de} | 77 | 1,26 \pm 0,02 ^{ef} |
| 5,8 | 9,3 \pm 0,1 | 220 \pm 7 | 108 \pm 12 | 81 \pm 9 | 231 \pm 12 | 178 \pm 5 | 32 \pm 1 ^{cd} | 77 | 1,35 \pm 0,01 ^{de} |
| 5,6 | 9,4 \pm 0,1 | 232 \pm 16 | 120 \pm 14 | 51 \pm 18 | 207 \pm 8 | 194 \pm 9 | 35 \pm 2 ^{bc} | 94 | 1,47 \pm 0,05 ^{cd} |
| 5,4 | 9,5 \pm 0,3 | 236 \pm 14 | 127 \pm 12 | 95 \pm 18 | 225 \pm 5 | 204 \pm 7 | 37 \pm 1 ^b | 91 | 1,55 \pm 0,04 ^{bc} |
| 5,2 | 9,5 \pm 0,2 | 198 \pm 2 | 107 \pm 5 | 87 \pm 20 | 238 \pm 4 | 219 \pm 5 | 40 \pm 1 ^{ab} | 92 | 1,66 \pm 0,03 ^{ab} |
| 5,0 | 9,3 \pm 0,1 | 229 \pm 11 | 123 \pm 7 | 87 \pm 6 | 220 \pm 19 | 228 \pm 6 | 42 \pm 1 ^a | 105 | 1,73 \pm 0,05 ^a |
| 4,8 | 9,2 \pm 0,5 | 206 \pm 2 | 121 \pm 4 | 67 \pm 2 | 224 \pm 7 | 177 \pm 6 | 32 \pm 1 ^{cd} | 79 | 1,34 \pm 0,03 ^d |
| pH libre | 8,9 \pm 0,1 | 110 \pm 6 | 73 \pm 2 | 13 \pm 5 | 145 \pm 17 | 148 \pm 7 | 27 \pm 1 ^e | 98 | 1,13 \pm 0,05 ^f |

^{a-f} Los valores con letras distintas son significativamente diferentes ($p < 0,05$); las comparaciones se realizaron mediante el análisis de la varianza (*one-way ANOVA*) seguido de la prueba de Tukey HSD.

5.2.3. Actividad manitol 2-deshidrogenasa

Para evaluar la correlación entre la producción de manitol y la actividad MDH en cultivos a pH controlado, se realizaron determinaciones de la actividad enzimática en extractos intracelulares obtenidos a partir de cultivos de 8 h de incubación (Figura 5.5) crecidos en los distintos valores de pH. Se eligió este tiempo debido a que en estudios previos (Capítulo I) los mayores valores de actividad MDH se obtuvieron en cultivos de 8 h. Los extractos de células incubadas a pH 6,0 y 5,6 mostraron los mayores valores de actividad enzimática ($1,66 \pm 0,09$ y $1,61 \pm 0,14$ U/mg prot, respectivamente). Estos valores no fueron estadísticamente diferentes a los obtenidos con los extractos restantes, excepto al encontrado en el extracto de pH 4,8 ($1,00 \pm 0,24$ U/mg prot) que fue el valor de actividad MDH más bajo observado.

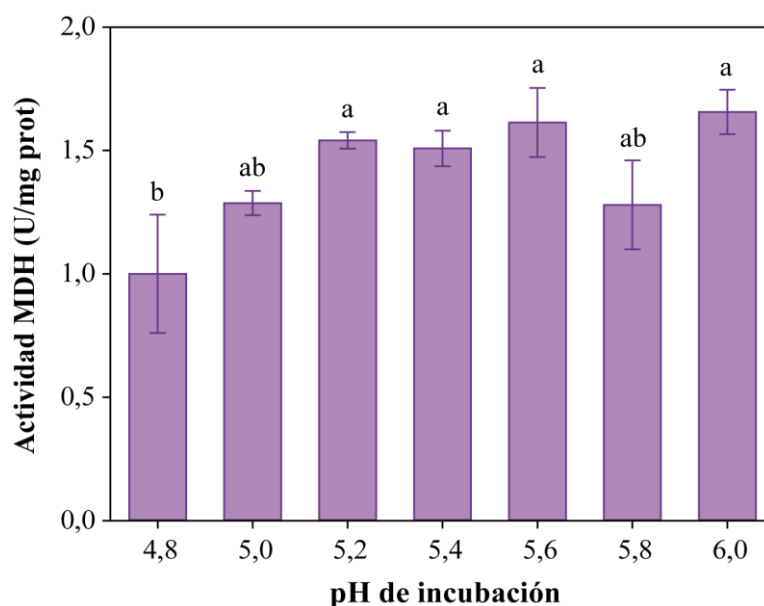


Figura 5.5 Actividad MDH de extractos libres de células de *L. reuteri* CRL 1101 incubadas a pH controlado en medio MLC durante 8 h. Los valores informados representan las medias \pm SD de tres experimentos independientes. ^{a-b} Los valores con letras distintas son significativamente diferentes ($p < 0,05$). Las comparaciones se realizaron mediante el análisis de la varianza (*one-way ANOVA*) seguido de la prueba de Tukey HSD.

5.2.4. Efecto de la biomasa inicial en la producción de manitol

Los experimentos previos se realizaron utilizando una biomasa inicial (inóculo) de aproximadamente 0,001 g/L (peso seco) de modo de lograr un recuento celular de

1×10^6 UFC/mL. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del aumento de la biomasa inicial en la producción de manitol usando el medio MLC en condiciones de cultivo optimizadas (7,5% azúcares de melaza, pH 5,0, 100 rpm, 37 °C, 24 h). Se evaluaron incrementos equivalentes a 10, 100, 1000 y 2000 veces la concentración de biomasa inicial (que corresponden a 0,01; 0,1; 1 y 2 g/L, respectivamente), utilizando células crecidas en el mismo medio y cosechadas en fase logarítmica. Se utilizó como control el cultivo crecido en condiciones optimizadas con una biomasa inicial de 0,001 g/L (Figura 5.4.c-d).

Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 5.6 y 5.7 y en la Tabla 5.4. La viabilidad celular alcanzada a las 24 h fue menor en todos los casos respecto al control (Tabla 5.4), presentando crecimientos celulares reducidos en comparación con éste ($\Delta \log$ UFC/mL: 2,91; Δ peso seco: 2,70 g/L, Figura 5.6.a), principalmente el cultivo inoculado con 2 g/L (inóculo 2000 veces mayor al control), donde las células se mantuvieron viables pero prácticamente sin multiplicarse a lo largo de la fermentación ($\Delta \log$ UFC/mL: 0,24; Δ peso seco: 1,60 g/L) (Figura 5.7.g). No obstante, las células presentaron una intensa actividad metabólica mostrando un elevado consumo de glucosa (238-324 mM) y fructosa (220-336 mM) hasta las 24 h de incubación (Tabla 5.4) lo que podría deberse al estadio de crecimiento celular (fase logarítmica) al momento de cosechar las células. El consumo de azúcares fue más pronunciado cuando se inoculó mayor cantidad de células, llegando a agotarse al final de la fermentación en los cultivos inoculados con 1 y 2 g de biomasa/L.

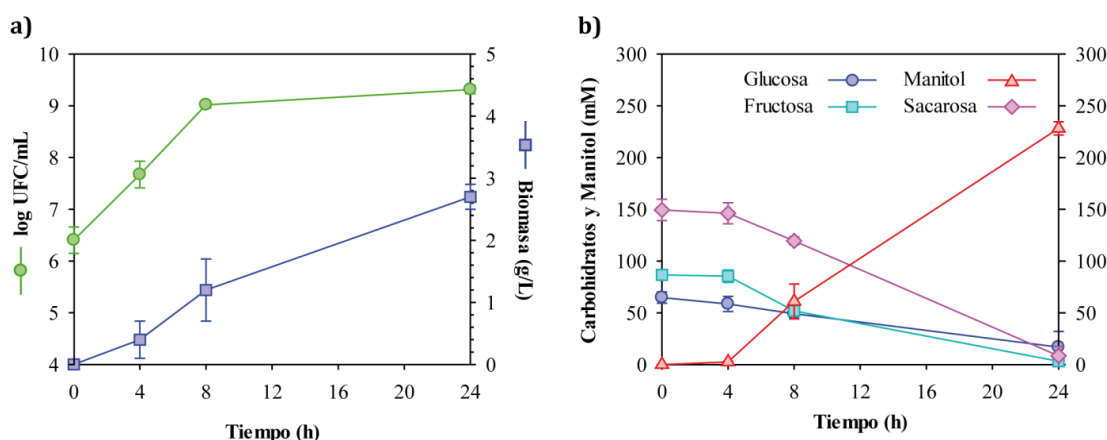
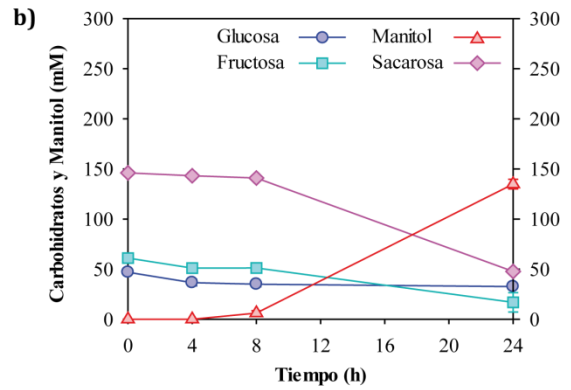
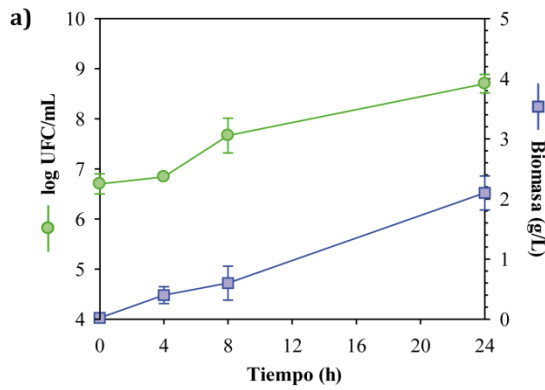
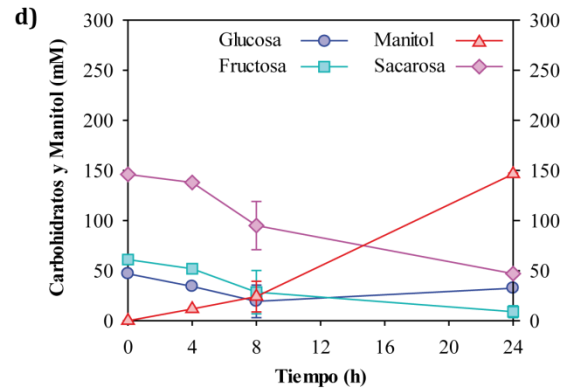
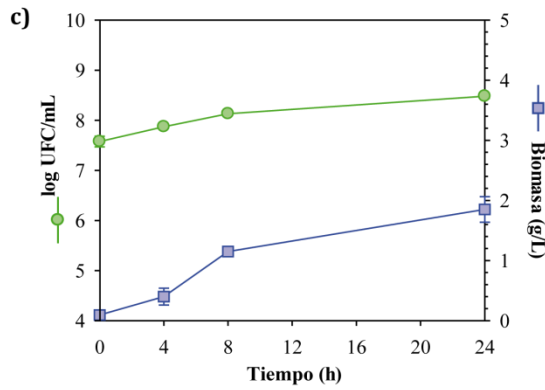


Figura 5.6 a) Crecimiento microbiano (viabilidad celular y peso seco) y b) consumo de azúcares y producción de manitol por *L. reuteri* CRL 1101 cultivado en medio MLC a 37°C durante 24 h utilizando una biomasa inicial de 0,001 g/L.

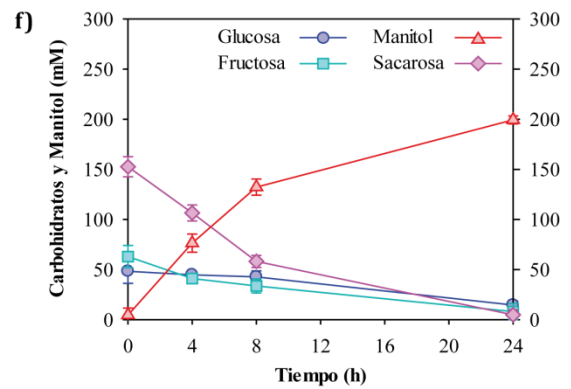
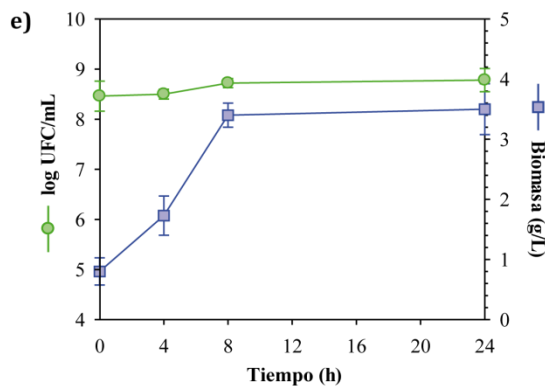
Biomasa inicial: 0,01 g/L



Biomasa inicial: 0,1 g/L



Biomasa inicial: 1 g/L



Biomasa inicial: 2 g/L

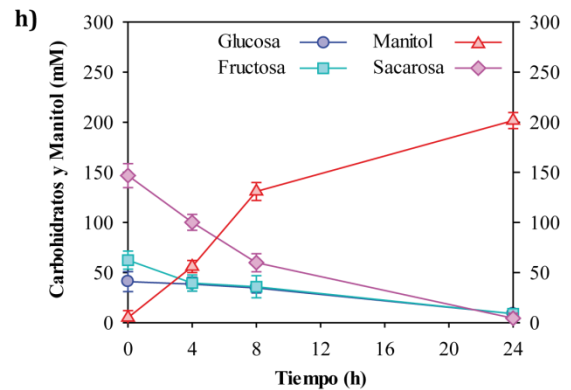
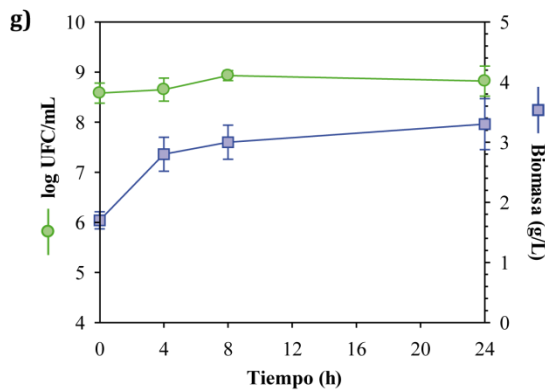


Figura 5.7 Crecimiento microbiano (viabilidad celular y peso seco), consumo de azúcares y producción de manitol de *L. reuteri* CRL 1101 cultivado en medio MLC a 37°C durante 24 h utilizando mayor biomasa inicial.

La producción de manitol a las 8 h de incubación en dichos cultivos (inóculos de 1 y 2 g/L) mostró valores de 132 ± 8 mM y 131 ± 9 mM, respectivamente (Figuras 5.7.f y h), siendo considerablemente mayores que la obtenida en el control (61 ± 17 mM, Figura 5.6.b). Por su parte, la producción final de manitol en los cultivos con 1 y 2 g biomasa inicial/L (199 - 202 mM) fueron cercanas a la obtenida en el control (228 mM); sin embargo, el incremento del inóculo causó una disminución tanto en el rendimiento (59 y 65% , respectivamente) como en la productividad volumétrica ($1,50$ y $1,54$ g/L h, respectivamente) a las 24 h, respecto al control (Y_{Mtl} : 105% ; Q_{Mtl} : $1,73$ g/L h) (Tabla 5.4). Estos resultados sugieren que el aumento de la biomasa inicial no mejoró la producción de manitol a las 24 h, aunque a las 8 h se obtuvo una mayor concentración del polirol en comparación con el control.

Tabla 5.4 Efecto de la biomasa inicial sobre la viabilidad celular y la producción de manitol por *L. reuteri* CRL 1101 en medio MLC a 37 °C y pH 5,0 a las 24 h de incubación.

| Biomasa inicial (g/L, peso seco) | Viabilidad celular (log UFC/mL) | Glucosa total consumida (mM) | Fructosa total consumida (mM) | Manitol | | Y_{Mtl} (%) | Q_{Mtl} (g/L h) |
|----------------------------------|---------------------------------|------------------------------|-------------------------------|--------------|------------|---------------|-------------------|
| | | | | mM | g/L | | |
| 0,001 | $9,3 \pm 0,1$ | 238 ± 8 | 220 ± 19 | 228 ± 6 | 42 ± 1 | 105 | $1,73 \pm 0,05$ |
| 0,01 | $8,7 \pm 0,2$ | 292 ± 1 | 231 ± 7 | 135 ± 5 | 25 ± 1 | 58 | $1,04 \pm 0,02$ |
| 0,1 | $8,5 \pm 0,1$ | 296 ± 2 | 240 ± 6 | 146 ± 6 | 27 ± 1 | 49 | $1,12 \pm 0,04$ |
| 1 | $8,8 \pm 0,2$ | 324 ± 12 | 336 ± 10 | 199 ± 15 | 36 ± 3 | 59 | $1,50 \pm 0,01$ |
| 2 | $8,8 \pm 0,3$ | 311 ± 14 | 324 ± 9 | 202 ± 9 | 37 ± 2 | 65 | $1,54 \pm 0,03$ |

5.2.5. Aislamiento de manitol producido por *L. reuteri* CRL 1101 en condiciones optimizadas

Se llevaron a cabo fermentaciones en condiciones optimizadas (7,5% de azúcares de melaza, pH 5,0, 100 rpm, inóculo inicial igual a 0,001 g/L, 37 °C, 24 h de incubación), en medio MLC; bajo estas condiciones *L. reuteri* CRL 1101 produce 42 g/L (Tabla 5.4). Dado que el manitol cristaliza en soluciones con concentraciones mayores a 180 g/L cuando se incuba a 4 °C, fue necesario concentrar 5 veces el sobrenadante del cultivo fermentado para obtener una concentración de ~ 200 g/L.

En la Figura 5.8 se muestran los pequeños cristales en forma de aguja que se observaron en el sobrenadante concentrado (5X) y mantenido a 4 °C durante 48 h. La Figura 5.9

muestra los cristales tal como se observan al microscopio óptico, con un aumento total de 400 veces (objetivo 40X, ocular 10X). En la Figura 5.10 se muestran cristales de mayor tamaño, formados en una solución pura de manitol (190 g/L, control positivo).

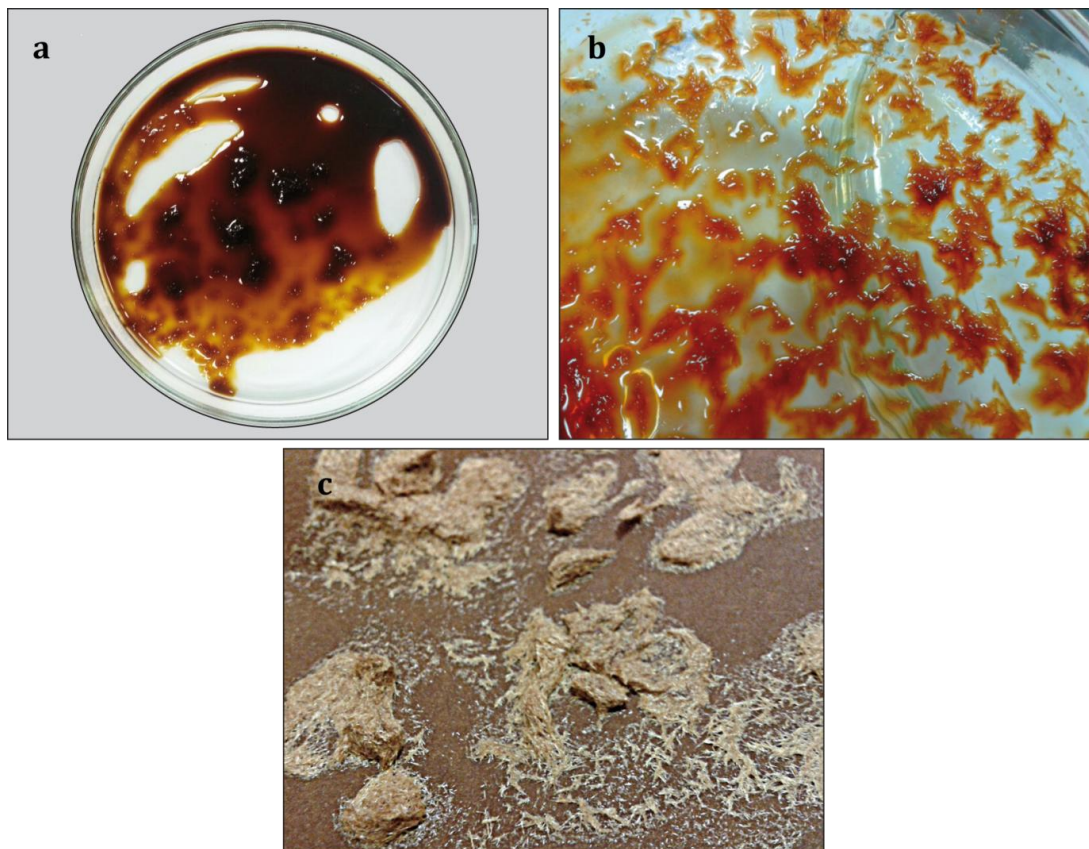


Figura 5.8 Cristales de manitol formados a partir de sobrenadantes de cultivos de *L. reuteri* CRL 1101, incubados a 4°C durante 48 h. a-b) Cristales de manitol observados en el sobrenadante concentrado previo a la filtración, c) Cristales de manitol filtrados sobre papel.



Figura 5.9 Cristales de manitol de *L. reuteri* CRL 1101 vistos al microscopio óptico, aumento total: 400 veces (objetivo 40X, ocular 10X).

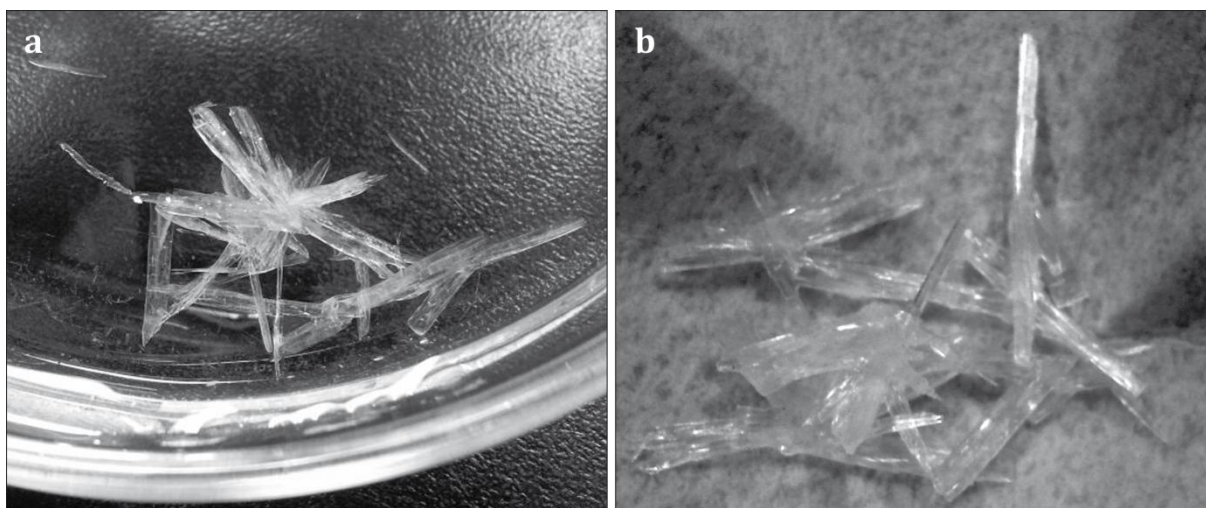


Figura 5.10 Cristales de manitol provenientes de una solución pura de manitol (190 g/L, control de cristalización) luego de una incubación a 4 °C durante 48 h. a) Cristales en solución, b) Cristales filtrados sobre papel.

5.3. DISCUSIÓN

Uno de los principales desafíos en la optimización del proceso productivo de un compuesto de interés industrial es la sustitución o reducción de aquellos componentes costosos presentes en el medio y, en consecuencia, la formulación de un medio más sencillo que permita la formación óptima del producto de interés a un menor costo.

En el presente capítulo se detalla el diseño de un medio de cultivo minimizado utilizando melaza de caña de azúcar como fuente de carbono. Para ello, se estudió la sustitución de la peptona de carne o el extracto de carne por peptona de soja, ya que ésta constituye una fuente de nitrógeno más económica. Aunque la cepa fue capaz de crecer en presencia de peptona de soja, la producción de manitol fue prácticamente nula por lo que se descartó su incorporación al medio de cultivo. Por otra parte, se vio que el sulfato de manganeso es necesario para el crecimiento óptimo de *L. reuteri* CRL 1101; sin embargo, su ausencia no afectó la viabilidad celular ni la formación de manitol cuando la glucosa se reemplazó por melaza de caña de azúcar como fuente de carbono. Este hecho sugiere que la melaza podría contener iones Mn^{2+} o algún otro componente que ejerce el mismo efecto positivo. Por lo tanto, esta sal no se incluyó en la formulación del medio de cultivo minimizado conteniendo melaza. Saha (2006b) utilizó melaza y jarabe de alto contenido en fructosa como fuentes de carbono de bajo costo para la producción de manitol por *L. intermedius* NRRL B-3693. Además, evaluó diferentes fuentes de nitrógeno orgánicas e inorgánicas de bajo costo para reemplazar la peptona de carne y el extracto de levadura. La cepa *L. intermedius* NRRL B-3693 fue capaz de producir 105 g/L de manitol luego de 22 h de incubación en un medio de cultivo conteniendo peptona de soja (5 g/L) y una mezcla de melaza y jarabe de alto contenido en fructosa (relación 1:1 jarabe de fructosa:melaza, 150 g/L de azúcares totales, relación 4:1 fructosa:glucosa). Es importante destacar que no todos los lactobacilos son tan altamente osmotolerantes como *L. intermedius* NRRL B-3693 que es capaz de crecer en presencia de 15% (p/v) de azúcar.

Fontes y col. (2009) utilizaron el jugo del fruto de la castaña de cajú como sustrato alternativo para evaluar la producción de manitol por BL. Este fruto es un residuo

industrial rico en fructosa y glucosa, fibras, vitaminas y sales (Campos y col., 2002). Se evaluó su utilización solo y mezclado con sacarosa como sustrato para la producción de manitol por *Leuc. mesenteroides* B-512F en un proceso de dos etapas que consistía primero en el crecimiento del microorganismo a pH 6,5 (óptimo de crecimiento) durante 8 h y posterior incubación a pH libre para la producción de manitol hasta completar las 24 h de fermentación. La adición de sacarosa mejoró el rendimiento (85%) pero disminuyó la productividad volumétrica (1,6 g/L h) en comparación con los valores obtenidos solamente con el jugo de fruta (70% y 2,2 g/L h, respectivamente) luego de 20 h de incubación. Los máximos valores de producción de manitol (18 g/L), rendimiento (67%) y productividad volumétrica (1,8 g/L h) se obtuvieron combinando jugo de manzana de castaña (25 g/L de azúcares totales) y sacarosa (25 g/L) a las 10 h de incubación.

En otro estudio, Carvalheiro y col. (2011) utilizaron jarabe de algarroba para evaluar el crecimiento microbiano y la producción de manitol por ocho cepas de BL. Los carbohidratos normalmente presentes en dicho jarabe son sacarosa —mayor al 50% del total de azúcares—, fructosa y glucosa. Para aumentar el contenido de fructosa y glucosa libres, se llevó a cabo la hidrólisis de la sacarosa presente en el jarabe de algarroba mediante el método de hidrólisis ácida. Las cepas estudiadas produjeron manitol con eficiencias relativamente altas (0,7 g de manitol/g de fructosa); los mejores resultados respecto de la producción de manitol (44 g/L), productividad volumétrica (2,36 g/L h) y rendimiento (100%) fueron exhibidos por *L. fructosum* NRRL B-2041 a las 30 h de incubación. Estos resultados son similares a los obtenidos en esta Tesis (producción de manitol: 42 ± 1 g/L; Y_{Mtl} : 105%), excepto por la productividad volumétrica, que fue menor en nuestro caso ($1,73 \pm 0,05$ g/L h). Resulta interesante destacar que nuestros resultados se lograron utilizando un medio de cultivo minimizado a base de melaza en lugar de medio MRS suplementado. Además, no fue necesaria la hidrólisis previa de la sacarosa proveniente de la melaza ya que *L. reuteri* CRL 1101 es capaz de metabolizar este disacárido (Bae y Shoda, 2007; Dumbrepatil y col., 2008).

Recientemente, Papagianni y Legisa (2014) optimizaron la producción de manitol por una cepa de *L. reuteri* utilizando una estrategia de ingeniería metabólica. Para estimular

el flujo metabólico a través de la vía EMP en *L. reuteri* ATCC 55730, cepa productora de manitol, se introdujo una versión truncada del gen *tpfkA* que codifica para la versión funcional (que se genera luego de modificaciones postraduccionales que ocurren normalmente en el hongo) de la enzima 6-P-1 fructoquinasa de *A. niger* NRRL 2270.

En la cepa transformante, el flujo de carbono a través de la vía EMP fue reforzado siendo así capaz de crecer en presencia de una elevada concentración de glucosa (75 g/L). Dado que la demanda de NADH fue satisfecha, la fructosa disponible fue utilizada solo como aceptor alternativo de electrones transformándose exclusivamente en manitol. Esta estrategia permitió quintuplicar la producción de manitol (56 respecto a 10 g/L producida por la cepa parental) después de 102 h de fermentación.

Por otro lado, la producción de ácidos orgánicos, principalmente ácido láctico, por las BL durante su crecimiento, provoca la disminución del pH del medio de cultivo inhibiendo el crecimiento celular y la formación de los productos finales. En consecuencia, la aplicación de fermentaciones a pH controlado resulta útil para mejorar la viabilidad microbiana y la síntesis de productos de fermentación (productos de interés). En este capítulo se muestran las fermentaciones llevadas a cabo a pH controlado utilizando el medio minimizado MLC formulado para optimizar la producción de manitol por *L. reuteri* CRL 1101. Los mejores resultados se alcanzaron en fermentaciones a pH 5,0 obteniéndose 228 ± 6 mM (42 ± 1 g/L) de manitol, con un rendimiento de 105% y una productividad volumétrica de $1,73 \pm 0,05$ g/L h. Coincidentemente, Saha y Racine (2010) informaron un valor de pH óptimo de 5,0 para la producción de manitol por *L. intermedius* NRRL B-3693.

Las BL son microorganismos capaces de crecer a valores de pH que van desde 6,5 hasta 3,5 (Kashket, 1987; McDonald y col., 1990; Russell, 1991). Una característica particular de estas bacterias es la capacidad de disminuir su pH interno (pH_{in}) a medida que el pH externo (pH_{ex}) decrece durante el crecimiento (Nannen y Hutkins, 1991; Cook y Russell, 1994) manteniendo así un ΔpH constante entre el interior y el exterior de la célula, en lugar de mantener un pH_{in} constante. Siegumfeldt y col. (2000) encontraron que diferentes especies de BL incubadas a pH_{ex} de 5,0 mostraron valores de pH_{in} cercanos a 5,5 resultando en un ΔpH de entre 0,5 y 0,8 unidades. Dado que el pH óptimo para la

actividad de la enzima MDH de *L. reuteri* ATCC 53608 es de 5,4 (Sasaki y col., 2005) y 5,5 para *L. intermedius* NRRL B-3693 (Saha, 2004), estas enzimas podrían funcionar en su pH óptimo ($\text{pH}_{\text{in}} \sim 5,5-5,8$) cuando las BL se incuban a pH 5,0. Esto explicaría la elevada producción de manitol obtenida a ese valor de pH. Por el contrario, Yue y col. (2013) encontraron que los mayores valores de actividad MDH ($0,42 \pm 0,09$ U/mg prot) y velocidad de formación de manitol ($2,54 \text{ h}^{-1}$) se obtuvieron a pH 4,5 para la cepa mutante *L. brevis* 3-A5.

Con respecto al pH, en microbiología deben distinguirse cuatro valores de pH que no necesariamente coinciden: i) el pH de máximo crecimiento microbiano, ii) el pH de máxima producción de la enzima, iii) el pH de máxima estabilidad de la enzima, y iv) el pH de máxima actividad de la enzima (García Garibay y col., 2004). Con frecuencia se requiere la elección de un valor de pH en particular durante la fermentación para asegurar la máxima producción de metabolitos y para evitar cambios que puedan afectar las actividades enzimáticas. En algunos casos, el pH óptimo para el crecimiento microbiano y la producción de enzimas —especialmente para aquellas intracelulares— no coinciden con el valor de pH óptimo para la máxima actividad enzimática. Por ejemplo, la dextranacarasa producida por *Leuc. mesenteroides* se secreta con alta productividad a pH 6,5, valor adecuado para el crecimiento bacteriano aunque el pH de máxima actividad y estabilidad enzimática es de 5,2 (García Garibay y col., 2004). En el presente estudio, la actividad MDH encontrada fue similar en células crecidas a diferentes valores de pH (excepto en células crecidas a pH 4,8), sugiriendo que la producción de la enzima fue similar en todas las condiciones estudiadas. Sin embargo, dependiendo del pH_{in} , la actividad de la enzima podría ser mayor o menor, lo que explicaría las diferencias en la producción de manitol entre los cultivos realizados a diferentes valores de pH (6,0-4,8).

5.4. CONCLUSIONES PARCIALES

- Se formuló el medio de cultivo minimizado MLC que contiene (p/v) 7,5% de azúcares de melaza; 0,5 % de extracto de levadura y 1,0% de extracto de carne para la producción de manitol por *L. reuteri* CRL 1101.
- *L. reuteri* CRL 1101 fue capaz de crecer y producir manitol de eficientemente en el medio MLC en fermentaciones a pH controlado.
- La máxima producción de manitol por esta cepa fue de 228 ± 6 mM (42 ± 1 g/L), obtenida en caldo MLC a pH 5,0 a las 24 h de incubación, siendo ésta la mayor producción de manitol obtenida por una cepa salvaje de *L. reuteri* a la fecha. En estas condiciones se obtuvo la mayor productividad volumétrica ($1,73 \pm 0,05$ g/L h) y eficiencia de conversión óptima (Y_{Mtl} : 105%).
- El incremento en la biomasa inicial (inóculo) no causó un aumento en la producción de manitol en las condiciones estudiadas.
- Las condiciones de cultivo óptimas para la producción de manitol por *L. reuteri* CRL 1101 son: crecimiento en caldo MLC conteniendo melaza de caña de azúcar (7,5%, p/v) como fuente de carbono bajo agitación suave (100 rpm), inoculado con una biomasa inicial de 0,001 g/L incubado a pH 5,0 y 37 °C durante 24 h.
- Se logró aislar parcialmente cristales de manitol en las condiciones mencionadas.

CAPÍTULO III: ESTUDIOS MOLECULARES SOBRE LA PRODUCCIÓN DE MANITOL POR *Lactobacillus reuteri* CRL 1101

6.1. INTRODUCCIÓN

La enzima MDH, responsable de la conversión de fructosa en manitol, fue descrita en diversas especies de BL pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* (Martinez y col., 1963; Korakli y Vogel, 2003; Saha, 2004; Sasaki y col., 2005) y *Leuconostoc* (Sakai y Yamanaka, 1968; Hahn y col., 2003). Si bien su actividad ha sido estudiada en extractos intracelulares de estas BL aún no se realizaron estudios de expresión del gen *mdh* que codifica para dicha enzima. En el presente capítulo se evalúa la actividad MDH en extractos intracelulares de *L. reuteri* CRL 1101 en condiciones de producción de manitol (presencia de fructosa) vs condiciones de no producción (ausencia de fructosa) y la expresión relativa del gen *mdh* mediante la técnica de PCR cuantitativa. Por otro lado, es importante profundizar los conocimientos sobre qué vías metabólicas y proteínas, además de la enzima MDH, están afectadas por la producción de manitol en las diferentes condiciones, dado que no hay antecedentes de este tipo de estudio. Por todo esto, el estudio de las bases moleculares de la producción de manitol se verá complementado con un análisis de la expresión diferencial de proteínas intracelulares de *L. reuteri* CRL 1101 en las condiciones mencionadas, mediante la técnica de electroforesis bidimensional.

La **PCR cuantitativa** (del inglés *quantitative Polymerase Chain Reaction*, qPCR) es una variante de la técnica de PCR convencional que permite la amplificación y la cuantificación simultáneas de las moléculas de ADN presentes en una muestra utilizando *primers* o cebadores específicos de secuencia. Cuando la qPCR se combina con una

reacción de transcripción reversa (RT-PCR) puede determinarse la cantidad de ADNc de cadena simple obtenido a partir del ARNm de una muestra; en este caso se denomina RT-qPCR, y es la metodología utilizada en esta Tesis. Para la cuantificación se emplea un fluoróforo que se une al fragmento amplificado de forma cuantitativa, de manera que a mayor cantidad de fragmento amplificado, se emitirá mayor fluorescencia. La detección de la fluorescencia se realiza luego de cada ciclo de amplificación y es por ello que esta técnica también se denomina **PCR en tiempo real** (del inglés *real time PCR*). Los programas de análisis representan gráficamente dicha fluorescencia respecto al número de ciclos. La cantidad de fragmento amplificado es proporcional al número de moléculas de ADN (o ADNc) iniciales, de forma que en aquellas muestras con mayor expresión del gen, la fluorescencia aparecerá en ciclos más tempranos mientras que en las muestras con menor expresión, la fluorescencia se hará detectable en ciclos tardíos (Schmittgen y Livak, 2008).

La qPCR permite llevar a cabo una **cuantificación absoluta**, es decir determinar el número de copias de un determinado fragmento en una muestra, o bien una **cuantificación relativa**, determinando la cantidad relativa de un fragmento de interés respecto a otro. En la cuantificación relativa se compara entre diferentes muestras (tejidos, tratamientos, tiempos, etc.) la cantidad relativa del ARNm del gen de interés respecto a la cantidad de ARNm de un gen generalmente constitutivo, denominado "gen normalizador", que se selecciona debido a que su expresión no varía en las condiciones del experimento (Livak y Schmittgen, 2001; Pfaffl, 2001; Schmittgen y Livak, 2008). Esto se denomina **normalización** de la expresión del gen específico, es decir que al efectuar la medición de la expresión del gen de interés en diferentes muestras y relacionarla con la expresión del gen normalizador en dichas muestras, es posible comparar los primeros aún sin conocer en términos absolutos su nivel de expresión. Los genes normalizadores se denominan en inglés *housekeeping genes* dado que generalmente están involucrados en las funciones básicas de la supervivencia celular, lo cual suele implicar una expresión constitutiva (Thellin y col., 1999; Suzuki y col., 2000). Esta expresión constante trae aparejada la ventaja adicional de asegurar la estandarización de la cantidad de ADN (o ADNc) total utilizada —que debe ser la misma para todas las muestras—, ya que si la

cantidad del gen normalizador varía será debido a cambios en la cantidad de ADN (o ADNc) total empleada y no a cambios en su expresión.

Uno de los métodos más utilizados para la cuantificación por su menor costo es el empleo de fluoróforos que se unen a ADN de doble cadena, como SYBR Green. Éste es un fluoróforo de alta sensibilidad ya que puede llegar a detectar una única molécula de ADN específico. SYBR Green se une con gran afinidad al surco menor del ADN de doble cadena, se acoplan energéticamente y aumenta su fluorescencia alrededor de 1000 veces. Este tipo de fluoróforos no son específicos ya que se unen a toda molécula de ADN de doble cadena, incluyendo los **dímeros de primers**. La formación de estos artefactos ocurre frecuentemente cuando la PCR se realiza por más de 30 ciclos, cuando el gen de interés está en muy baja concentración o cuando los *primers* están en concentraciones muy elevadas. En este último caso se requiere una previa optimización en el uso de los *primers*. Para ello se evalúan tres concentraciones de *primers forward* y *reverse* (generalmente 50 nM, 300 nM y 900 nM) y se selecciona aquella que permita obtener la máxima eficiencia y sensibilidad en la amplificación (en nuestro caso la concentración utilizada fue 200 nM tal como se detalla en Materiales y Métodos).

La formación de dímeros de *primers* puede identificarse mediante el análisis de las **curvas de melting** (o curvas de disociación). Estas curvas se construyen a partir del monitoreo de la cinética de disociación de cada fragmento amplificado y se determina su temperatura de fusión o T_m (del inglés *melting temperature*). La T_m depende del contenido en GC, la longitud y la secuencia de cada fragmento en particular, por lo que la T_m es específica para cada gen de interés (Ririe y col., 1997). La T_m de los dímeros es menor que la de los productos de interés por lo que, en las muestras donde se formaron dímeros, se pueden observar dos curvas diferentes, indicando que la fluorescencia de esta muestra viene dada por el fragmento amplificado y por los dímeros de *primers*.

Con respecto al estudio de la expresión diferencial de proteínas intracelulares de *L. reuteri* CRL 1101 en las condiciones mencionadas, éste se llevó a cabo mediante la técnica de **electroforesis bidimensional (2DE)**, comúnmente utilizada para separar y analizar una mezcla de proteínas. Esta técnica fue introducida por primera vez de forma independiente por Klose y por O'Farrell en 1975, y consiste es una combinación

secuencial de las técnicas de i) Isoelectroenfoque (primera dimensión), donde las proteínas se separan según su punto isoeléctrico (pI) y ii) electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (segunda dimensión), donde las proteínas se separan según su PM. De este manera es posible separar proteínas de masa molecular idéntica que difieren en su pI o proteínas con valores de pI similares pero con diferentes PM (Klose, 1975; O'Farrell, 1975).

La proteómica puede definirse como el análisis del conjunto de proteínas expresadas en una célula o en cualquier muestra biológica en un determinado momento y bajo condiciones específicas (Dierick y col., 2002). Dado que el genoma de un organismo es prácticamente estático, mientras que el proteoma es altamente dinámico, la analogía del genoma y el proteoma es solo superficial. Las variaciones en el proteoma se deben a que: 1) no todas las proteínas se expresan al mismo tiempo, 2) las proteínas pueden expresarse en cantidades diferentes según las condiciones, 3) se pueden producir varias formas de una misma proteína debido a las modificaciones postraduccionales y 4) diferentes tipos de células en organismos multicelulares expresan conjuntos especializados de proteínas. La dinámica de la expresión de proteínas también es depende en gran medida del estado celular y el medio ambiente. Teniendo en cuenta todas las posibilidades, cualquier genoma dado puede potencialmente dar lugar a un número infinito de proteomas (Graves y Haystead 2002).

Dentro de la proteómica se agrupan diferentes áreas de estudio, incluyendo los estudios de interacción proteína-proteína, modificaciones postraduccionales, función de proteínas y localización de proteínas. De acuerdo con su objetivo principal, la proteómica se puede dividir en tres tipos: proteómica de expresión de proteínas, proteómica estructural y proteómica funcional. En este trabajo de Tesis se aplica la **proteómica de expresión de proteínas** que comprende el análisis cuantitativo de la expresión de proteínas entre muestras que difieren en una o más variables. Esta estrategia compara la expresión del proteoma entre diferentes muestras. Los datos obtenidos permiten la identificación de proteínas implicadas en diferentes funciones celulares o proteínas de interés para el metabolismo de microorganismos (Champomier-Vergès y col., 2010).

6.2. RESULTADOS

6.2.1. Influencia de la presencia de fructosa en la actividad MDH

Con el fin de determinar si la actividad MDH es inducida por fructosa, la cepa se cultivó en caldo MRS con 2% (p/v) de glucosa y 5% (p/v) de fructosa (MRS_{GF}) como fuentes de carbono a 37 °C durante 24 h. Como control negativo de producción de manitol se utilizó caldo MRS con 7% (p/v) de glucosa (MRS_G). En esta experiencia se usaron concentraciones de azúcares similares a la óptima para la producción de manitol. La actividad enzimática específica se evaluó en extractos proteicos intracelulares de células cosechadas a las 4, 8 y 24 h de incubación. Además se determinó el crecimiento celular (DO₆₀₀ y UFC/mL), pH del medio, la producción de manitol y la concentración de azúcares residuales (HPLC) a lo largo de la fermentación.

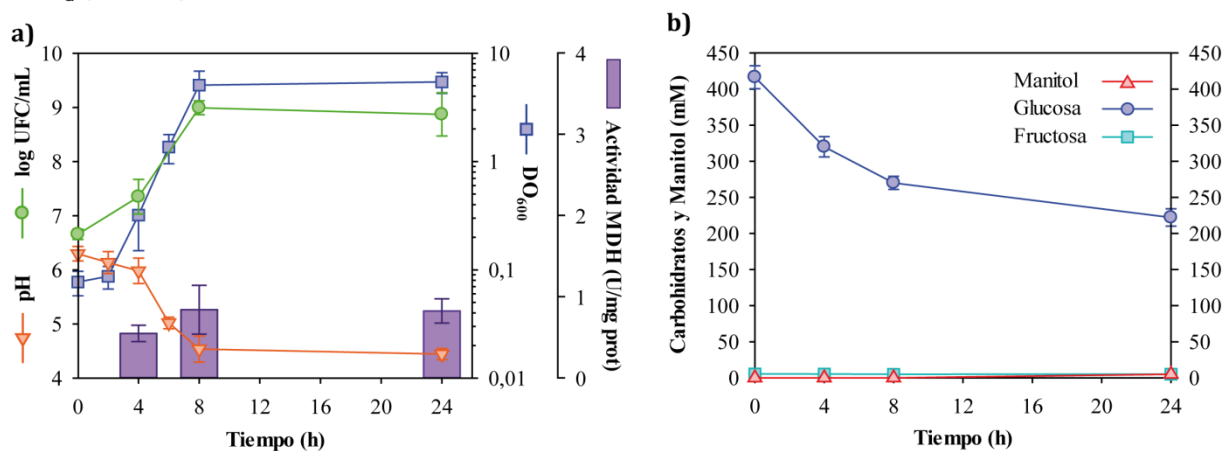
El crecimiento celular fue óptimo en ambos medios, alcanzando la fase estacionaria a las 8 h de incubación (Figura 6.1.a y c), momento en el que se registraron los mayores valores de recuento celular ($9,1 \pm 0,1$ y $8,7 \pm 0,6$ log UFC/mL en MRS_G y MRS_{GF}, respectivamente) que se mantuvieron inalterados hasta el final de la fermentación. En ambos medios el pH disminuyó a valores de 4,5-4,6 durante las primeras 8 h, manteniéndose estable hasta el final de la fermentación (4,2-4,4). Durante las primeras 8 h se observó un rápido consumo de glucosa en ambos medios de cultivo que disminuyó al entrar en fase estacionaria (Figura 6.1.b y d). En MRS_{GF} la glucosa se agotó a las 24 h de incubación, mientras que en MRS_G el 53% del total de glucosa inicial (416 ± 16 mM) quedó sin fermentar debido a su elevada concentración (7%, p/v) en el medio de cultivo. La producción de manitol se observó a partir de las 4 h de incubación; la máxima concentración obtenida fue 184 ± 12 mM (34 ± 2 g/L) a las 24 h en MRS_{GF}, mientras que en MRS_G no se detectó formación de manitol.

Con respecto a la actividad MDH, en el control negativo de producción de manitol (MRS_G) se detectó una actividad enzimática basal en todos los tiempos estudiados a pesar de que el medio de cultivo no contenía fructosa, sustrato necesario para la conversión a manitol (Figura 6.1.a). El mayor valor de actividad enzimática ($0,8 \pm 0,3$ U/mg prot) se observó a las 8 h de incubación. Esta actividad se incrementó en

presencia de fructosa (MRS_{GF}) siendo $1,5 \pm 0,2$ U/mg prot el máximo valor detectado a las 8 h, valor 1,9 veces mayor que el observado en el control (Figura 6.1.c).

El medio MRS contiene trazas de sacarosa (~ 2 mM) que podrían inducir la actividad basal MDH observada. Para evaluar si la enzima era constitutiva y no inducida por sacarosa se repitieron los estudios de inducción de actividad en un medio químicamente definido (CDM) utilizando las mismas concentraciones de azúcares, constituyendo los medios CDM_G y CDM_{GF}.

MRS_G (Control)



MRS_{GF}

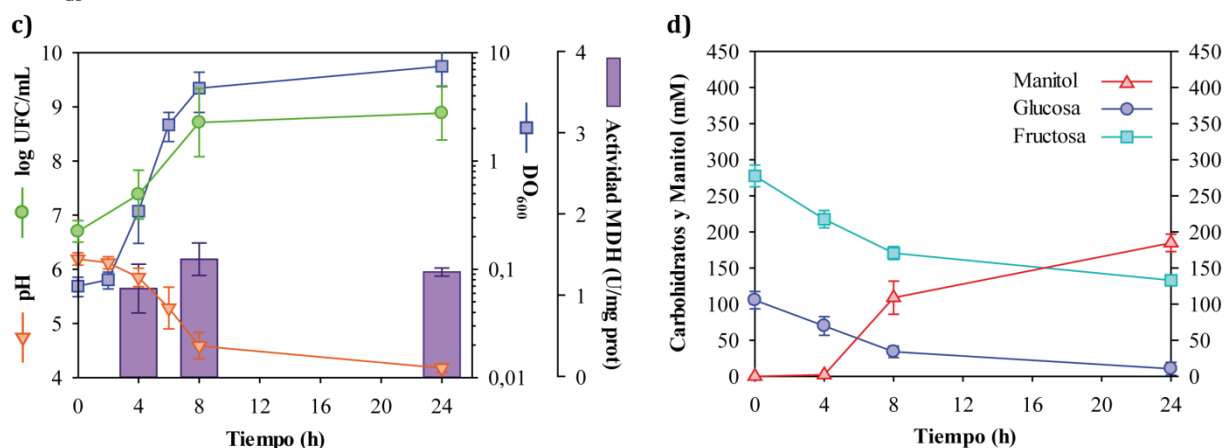
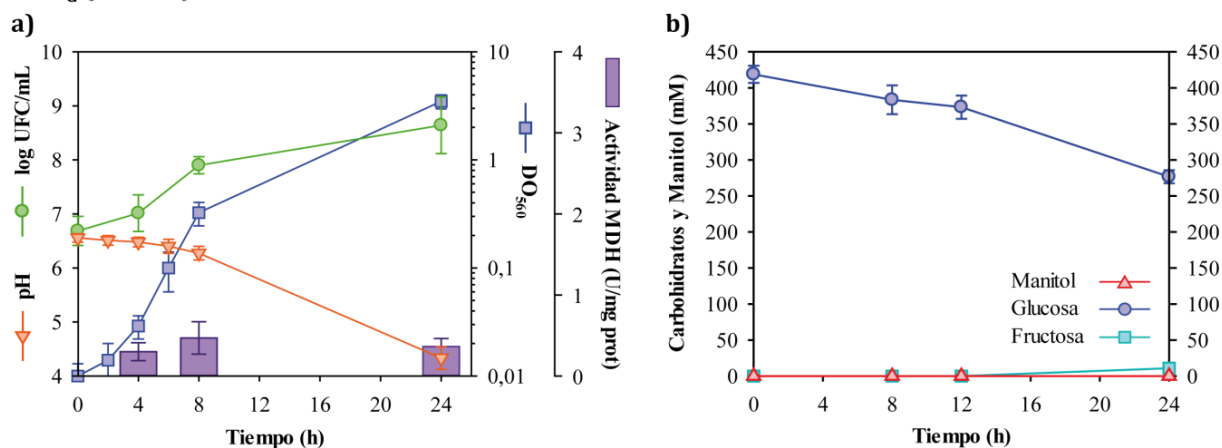


Figura 6.1 Crecimiento celular y actividad MDH de *L. reuteri* CRL 1101 en medios MRS_G y MRS_{GF} a pH libre durante 24 h. a, c) Cinética de crecimiento y actividad MDH específica; b, d) Consumo de carbohidratos y producción de manitol.

El crecimiento de *L. reuteri* CRL1101 en CDM fue más lento que en MRS, alcanzándose un recuento celular máximo de 8,6-8,7 log UFC/mL al final de la fermentación en ambos medios (Figura 6.2.a y c). A las 8 h de incubación los cultivos se encontraban aún en fase

logarítmica de crecimiento y hasta ese momento se observó un pequeño descenso del pH (0,29-0,33 unidades), disminuyendo 2,23-2,15 unidades luego de 24 h. El consumo de azúcares también fue más lento y contrariamente a lo observado en MRS_{GF} no hubo agotamiento de glucosa en CDM_G.

CDM_G (Control)



CDM_{GF}

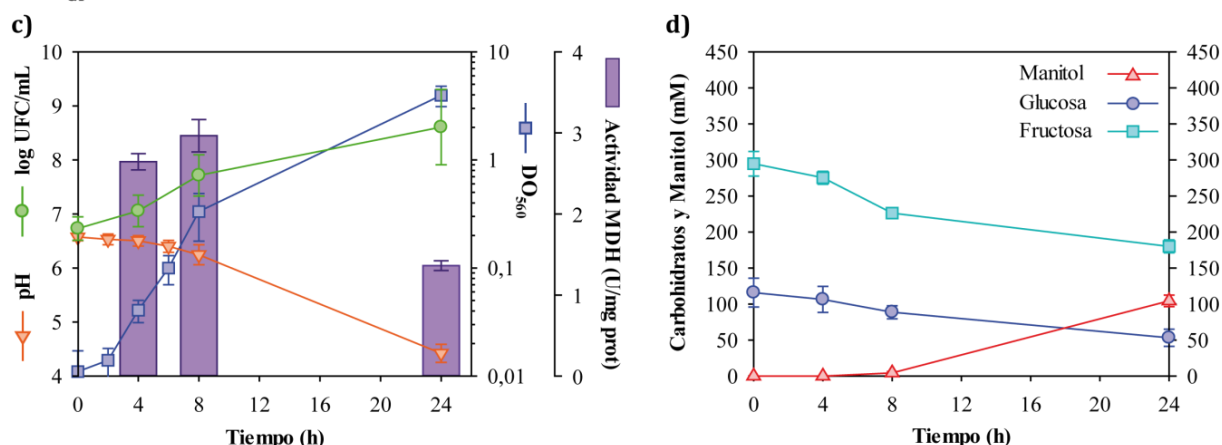


Figura 6.2 Crecimiento celular y actividad MDH de *L. reuteri* CRL 1101 en medios CDM_G y CDM_{GF} a pH libre durante 24 h. a, c) Cinética de crecimiento y actividad MDH específica; b, d) Consumo de carbohidratos y producción de manitol.

La síntesis de manitol comenzó a las 8 h alcanzando un valor máximo de 104 ± 8 mM (19 ± 2 g/L) a las 24 h de incubación. Este valor corresponde al 56% del alcanzado en MRS_{GF} en el mismo período de tiempo. Al igual que en MRS_G, en CDM_G se detectó una actividad MDH basal (entre 0,3 y 0,5 U/mg prot) en todos los tiempos ensayados, a pesar de la ausencia de fructosa en este medio. En presencia de fructosa (CDM_{GF}), la actividad MDH aumentó 8 y 6 veces ($2,6 \pm 0,1$ y $3,0 \pm 0,2$ U/mg prot) (Figura 2.6.c) a las 4 y 8 h de incubación respecto al control en los respectivos tiempos ($0,3 \pm 0,1$ y $0,5 \pm 0,2$ U/mg

prot) (Figura 6.2.a). Si bien la actividad basal presente en CDM_G fue menor a la encontrada en MRS_G, la actividad detectada sugiere que la enzima se expresa de manera constitutiva y que se induce fuertemente por fructosa. Resta dilucidar si la regulación de la expresión de MDH ocurre a nivel transcripcional (síntesis de ARNm) o traduccional (síntesis de proteína).

6.2.2. Estudio de la expresión relativa y la regulación transcripcional del gen *mdh* en presencia de fructosa

La expresión relativa del gen *mdh* de *L. reuteri* CRL 1101 en ausencia y presencia de fructosa se evaluó mediante la técnica de RT-qPCR a partir de extractos proteicos intracelulares de 8 h (fase logarítmica) y 24 h (fase estacionaria) de incubación crecidos en CDM_G y CDM_{GF}. Como gen normalizador se utilizó *pyrG* (que codifica para la enzima CTP sintetasa y participa en el metabolismo de nucleótidos) ya que su nivel de transcripción se mantuvo estable durante las condiciones utilizadas. Para la interpretación de los resultados de expresión relativa del gen *mdh* en las diferentes condiciones se utilizó el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$, descrito por Schmittgen y Livak (2008), utilizando como referencia la condición CDM_G 8 h a la cual se le asigna el valor arbitrario de 1.

En la Figura 6.3.a se muestra una gráfica representativa de las señales fluorescentes correspondientes a las diferentes condiciones ensayadas vs los ciclos de amplificación. La intersección entre la línea *Threshold* y cada curva de amplificación determina el C_T o Ciclo umbral (del inglés *threshold cycle*) de cada muestra; ciclo en el que se comienza a detectar el aumento de fluorescencia y es inversamente proporcional a la concentración inicial del ADN presente en la muestra. En la gráfica se observan las señales de los controles sin ADNc (NTC) luego de los 30 ciclos de amplificación; las señales de los controles positivos con ADN cromosómico antes de los 10 ciclos y las del gen normalizador *pyrG* alrededor del ciclo 20, mostrando niveles de expresión similares en todas las condiciones evaluadas. En la Tabla 6.1 se muestran los valores de C_T obtenidos para el gen *mdh* y el *housekeeping* en todas las condiciones estudiadas.

En la Figura 6.3.b se muestran las curvas de *melting* correspondientes a las muestras de *mdh* en distintas condiciones con sus respectivos duplicados. Se observa que todas las muestras generaron un solo pico a 82 °C, temperatura de fusión correspondiente al gen de interés. El análisis de las curvas de *melting* permite corroborar la ausencia de dímeros de *primers* –los cuales generarían un segundo pico a una T_m menor–, fundamental para evitar la generación de fluorescencia inespecífica que interfiera con la correcta interpretación de los resultados.

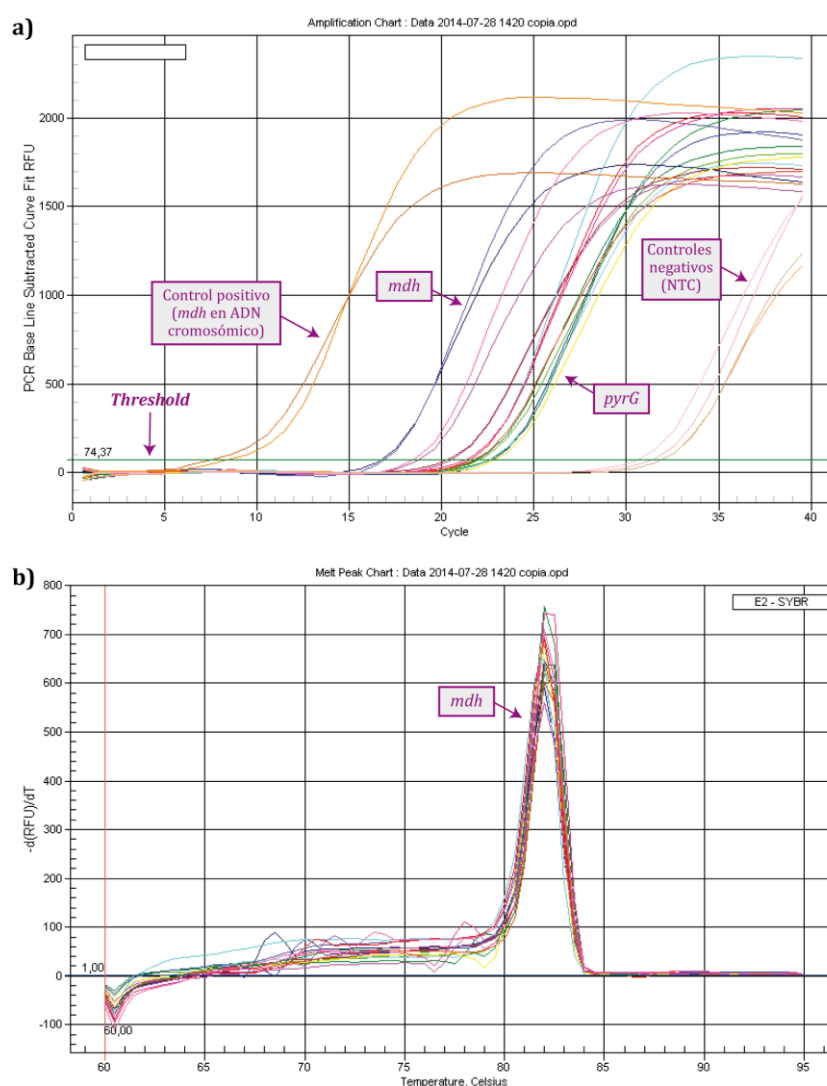


Figura 6.3 a) Imagen representativa de las curvas de amplificación de qPCR de *mdh* y *pyrG* en las distintas condiciones, *mdh* en muestras de ADN cromosómico (control positivo) y los controles negativos (NTC). El eje vertical representa la fluorescencia normalizada, y el eje horizontal el número de ciclos. La línea *Threshold* es el umbral en el que se produce un cambio significativo en la fluorescencia, y la intersección entre esta línea y cada curva de amplificación determina el C_T o Ciclo umbral (del inglés *threshold cycle*) de cada muestra que se emplea para la cuantificación; b) Curvas de *melting* de muestras amplificadas con los *primers* para *mdh*.

Tabla 6.1. Valores de C_T de los genes *mdh* y *pyrG* de *L. reuteri* CRL 1101 cultivado en CDM en ausencia y presencia de fructosa durante 8 y 24 h.

| Tiempo | Condición | Gen | C_T | |
|--------|-----------|-------------|----------|------|
| | | | Promedio | SD |
| 8 h | G | <i>mdh</i> | 23,35 | 0,89 |
| | | <i>pyrG</i> | 21,28 | 0,95 |
| | GF | <i>mdh</i> | 16,81 | 0,28 |
| | | <i>pyrG</i> | 20,13 | 0,47 |
| 24 h | G | <i>mdh</i> | 20,69 | 1,25 |
| | | <i>pyrG</i> | 21,23 | 1,43 |
| | GF | <i>mdh</i> | 19,62 | 0,43 |
| | | <i>pyrG</i> | 21,53 | 0,56 |

En la Figura 6.4 se muestran los valores de expresión relativa del gen *mdh* en ausencia y presencia de fructosa a las 8 y 24 h de incubación. Se detectó una expresión basal del gen *mdh* en ausencia de fructosa tanto en fase logarítmica (8 h, control) como en fase estacionaria (24 h), siendo este último valor 6 ± 3 veces mayor que el obtenido en el control. En presencia de fructosa, el gen *mdh* se expresó 42 ± 7 veces más en fase log (8 h) respecto al control, mientras que en fase estacionaria (24 h) esta expresión disminuyó siendo solo 16 ± 2 veces mayor que el control; sin embargo resultó ser 3 veces mayor que el valor encontrado a las 24 h en ausencia de fructosa (CDM_G : 6 ± 3). Estos resultados demuestran que el gen *mdh* se expresa de manera constitutiva en ausencia de fructosa, y que la presencia de este azúcar regula positivamente la expresión del gen, principalmente durante la fase logarítmica de crecimiento.

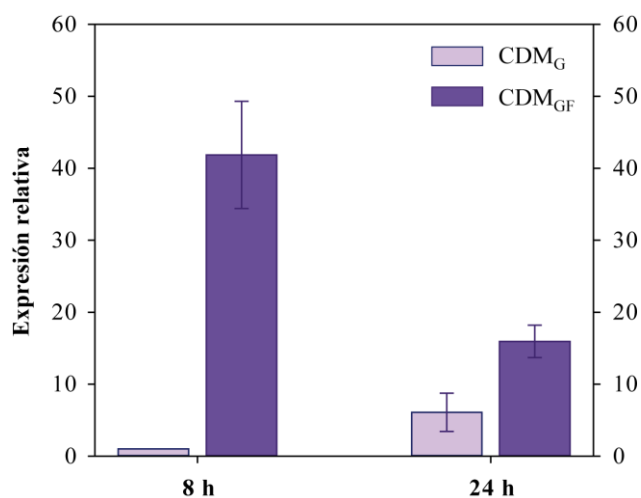


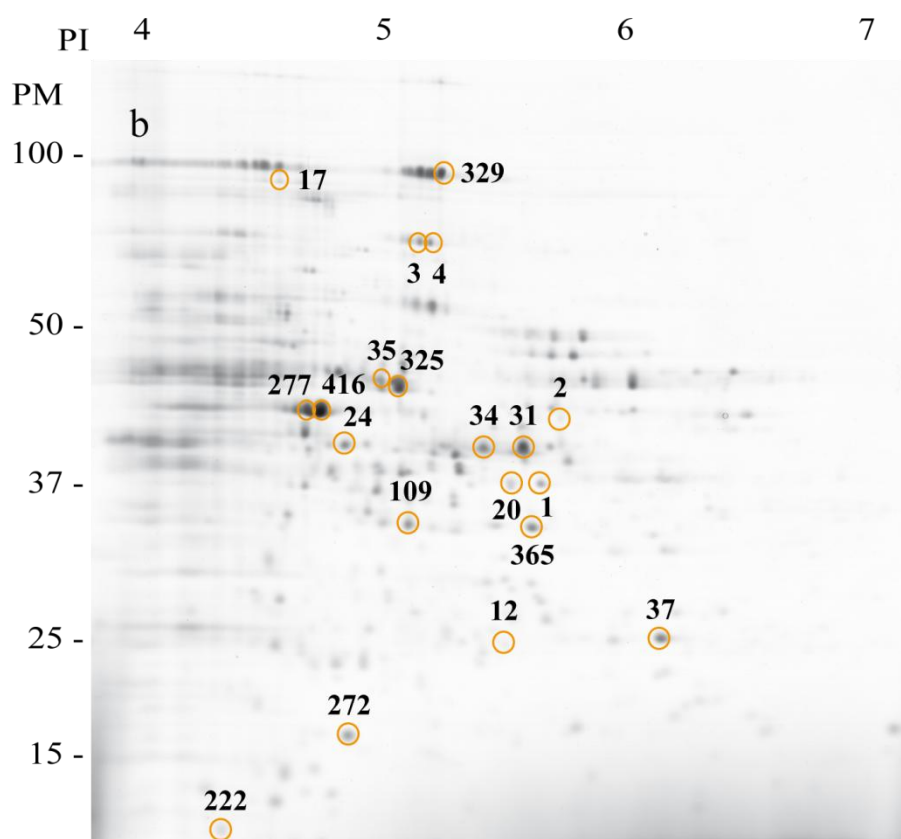
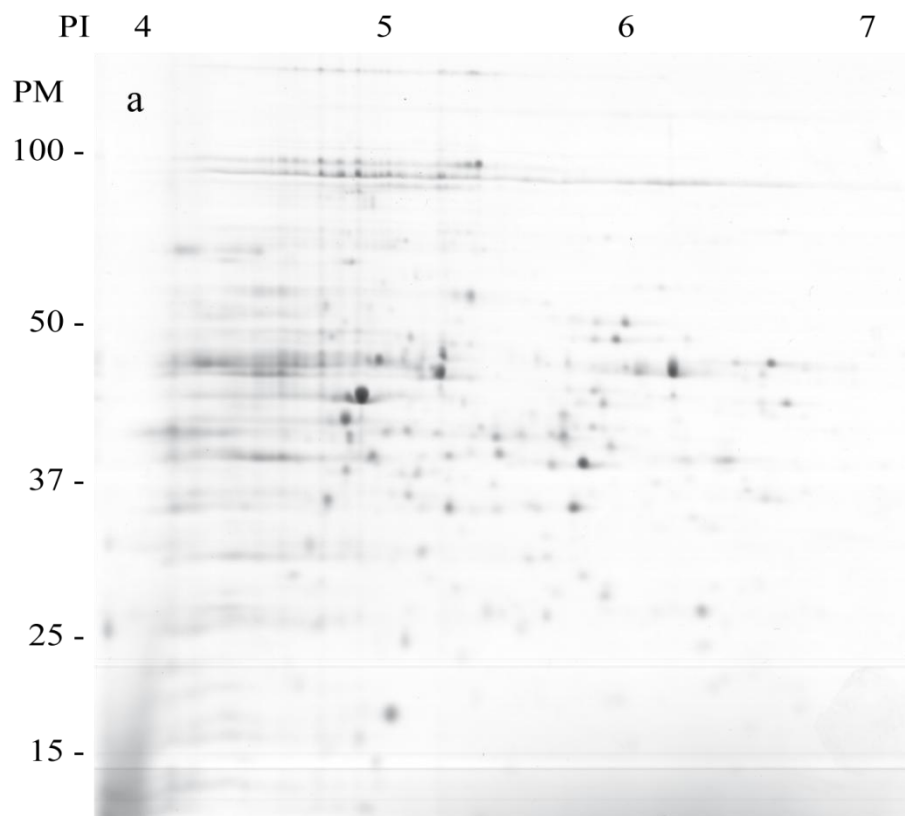
Figura 6.4 Expresión relativa del gen *mdh* en células de *L. reuteri* CRL 1101 crecidas en medios CDM_G y CDM_{GF} durante 8 y 24 h.

6.2.3. Expresión diferencial de proteínas intracelulares de *L. reuteri* CRL 1101 durante la producción de manitol mediante estudios proteómicos

Con el fin de estudiar la expresión diferencial de proteínas intracelulares de *L. reuteri* CRL 1101 durante la producción de manitol (presencia de fructosa) vs condiciones de no producción (ausencia de fructosa), la cepa se cultivó en CDM_{GF} (conteniendo 2% de glucosa y 5% de fructosa, p/v) y CDM_G (conteniendo 7% de glucosa, p/v) a 37 °C durante 24 h. Se cosecharon células a las 8 y 24 h de incubación, se obtuvieron los extractos proteicos intracelulares y se procedió al desarrollo de la técnica 2DE. La densitometría de los *spots* evidenciados luego de la tinción de los geles se llevó a cabo utilizando el programa *Prodigy SameSpot* (Nonlinear Dynamics Group) tomándose como referencia los *spots* obtenidos en presencia de glucosa a los tiempos respectivos.

A partir de los informes generados por el programa utilizado, se observó que en presencia de fructosa (y respecto al cultivo en glucosa, control negativo) y a las 8 h de incubación se expresaron diferencialmente 37 proteínas, 15 de las cuales fueron sobre-expresadas y 22 se regularon negativamente; en tanto que a las 24 h de incubación, 38 proteínas cambiaron su perfil de expresión en presencia de fructosa: 16 se regularon positivamente y 22 disminuyeron su expresión. A partir de estos resultados se seleccionaron 36 proteínas para su identificación por espectrometría de masas MALDI-TOF, de las cuales 26 proteínas se expresaron diferencialmente (niveles de expresión estadísticamente diferentes) y 10 no mostraron variaciones significativas pero resultaron interesantes por ser proteínas mayoritarias (*spots* intensos). De las 36 proteínas seleccionadas, 30 se identificaron exitosamente. En la Figura 6.5 se muestran imágenes representativas de los geles de los proteomas de *L. reuteri* CRL 1101 en las cuatro condiciones estudiadas, donde se señalan los *spots* que fueron identificados.

En presencia de fructosa y a las 8 h de incubación, del total de proteínas identificadas, 6 resultaron sobre-expresadas (*spots* 3, 4, 31, 34, 35 y 37), otras 6 fueron reprimidas (*spots* 1, 2, 12, 17, 20 y 24) y 8 proteínas se expresaron en ambas condiciones sin variaciones significativas (*spots* 22, 109, 272, 277, 325, 329, 365 y 416). En la Figura 6.6 se muestran las porciones de los geles donde se observan los diferentes *spots*.



Continúa en página siguiente

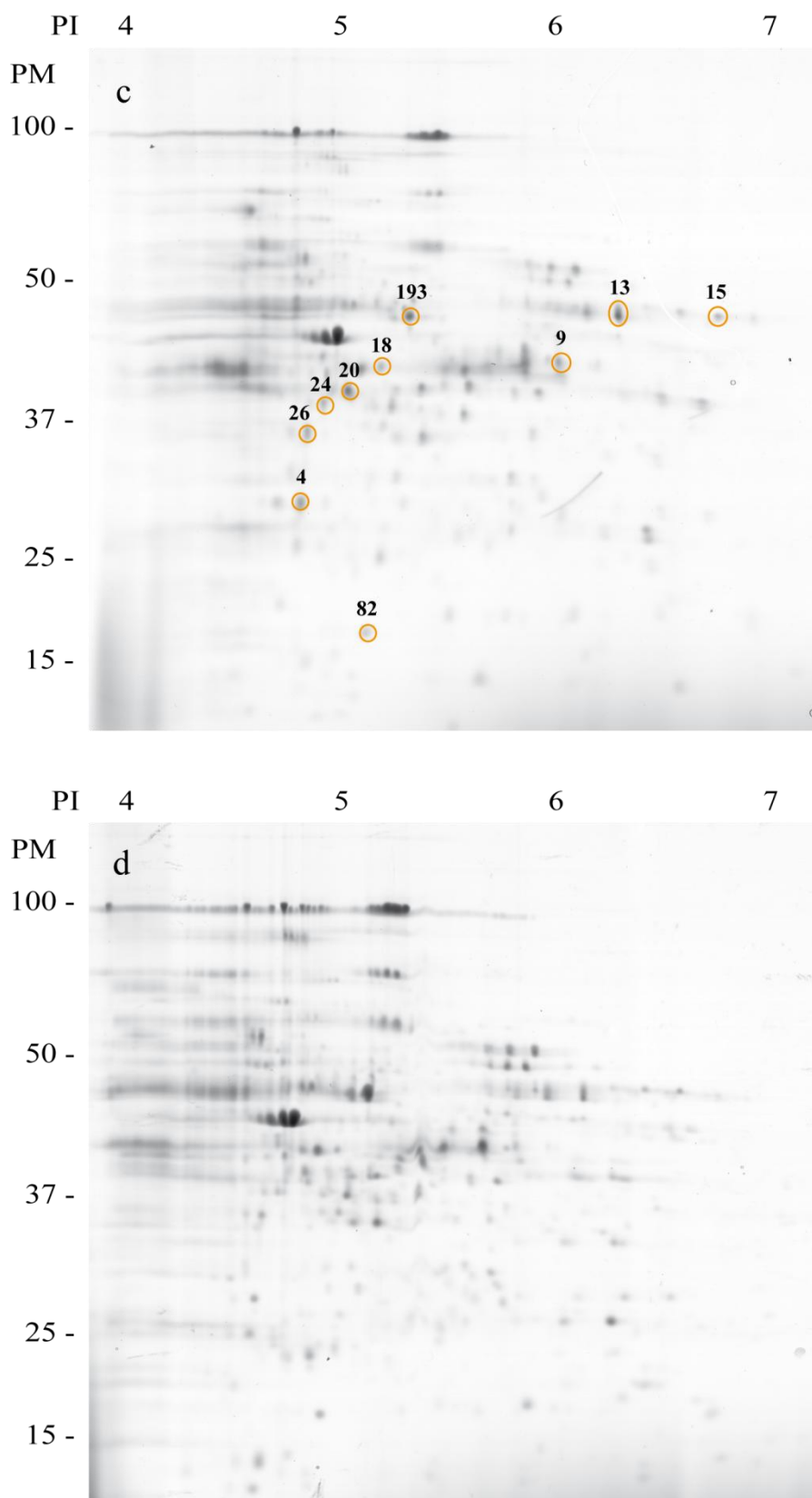
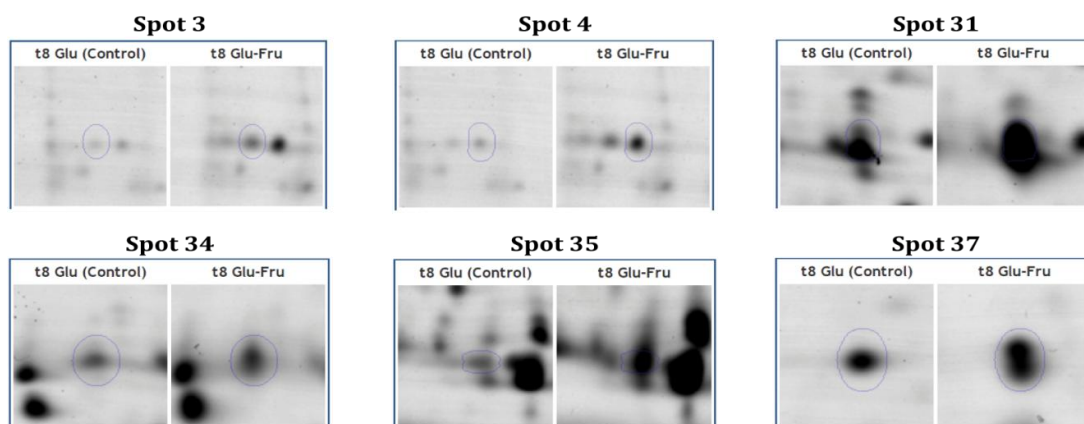
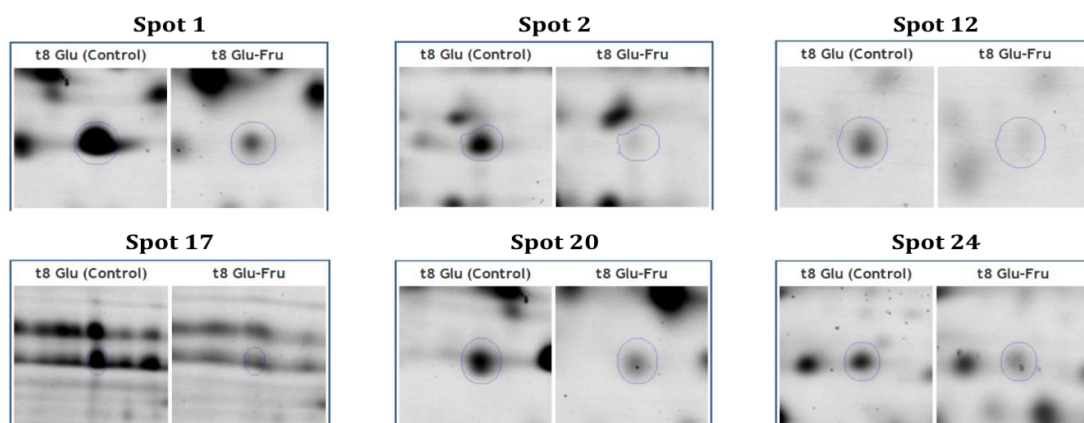


Figura 6.5 Proteomas de *L. reuteri* CRL 1101 en las cuatro condiciones estudiadas: a) 8 h en CDM_G b) 8 h en CDM_{GF}, c) 24 h en CDM_G y d) 24 h en CDM_{GF}. Con círculos numerados se indican los spots que se identificaron por MALDI-TOF. Se utilizó un gradiente de pH lineal.

a) Spots sobre-expresados en presencia de fructosa



b) Spots reprimidos en presencia de fructosa



c) Spots expresados en ambas condiciones

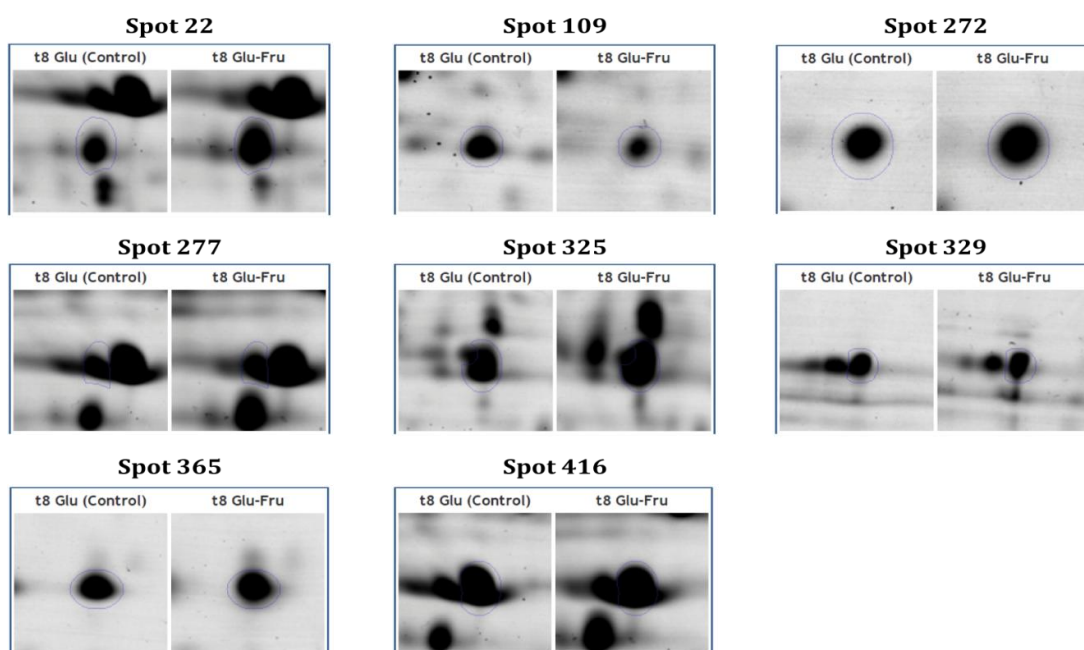


Figura 6.6 Porciones de geles bidimensionales donde se muestran los spots sobre-expresados (a) y reprimidos (b) en presencia de fructosa y aquellos expresados en ambas condiciones (c) a las 8 h de incubación. El spot considerado en cada caso se indica con una línea azul.

En la Tabla 6.2 se muestran los resultados del análisis cualitativo por espectrometría de masas de los *spots* identificados, las diferentes funciones asignadas y la cuantificación relativa de la expresión diferencial de proteínas por densitometría. Entre las proteínas sobre-expresadas en presencia de fructosa podemos distinguir dos enzimas que participan de la degradación de azúcares mediante la vía EMP: **gliceraldehído 3-P deshidrogenasa** (*spots* 31 y 34) y **fosfoglicerato mutasa dependiente de 2,3-difosfoglicerato** (*spot* 37). En la Figura 6.7 se muestra un esquema de dicha vía metabólica tomada de la base de datos *KEGG* disponible *on-line* (http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?lre00010+Lreu_0146), donde se pueden observar las reacciones que cataliza cada enzima. Por otra parte, se destaca la represión de la **ornitina carbamoiltransferasa** (*spots* 1 y 20) y **arginina deiminasa** (*spot* 2), dos enzimas que participan de la degradación de la L-arginina a través de la vía arginina-deiminasa (ADI). En la Figura 6.8 se muestra un esquema de dicha vía metabólica (base de datos *KEGG*, http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?lru00330+HMPREF0538_21647) y las reacciones catalizadas por estas enzimas. También se vieron reprimidas enzimas que participan en el metabolismo de nucleótidos (purina nucleósido fosforilasa tipo deoD, *spot* 12), en el metabolismo de fuentes de carbono alternativas (acetaldehído CoA/alcohol deshidrogenasa bifuncional, *spot* 17) y en el metabolismo de glicerolípidos (glicerol deshidrogenasa, *spot* 24). Por otro lado, las proteínas que se expresaron en ambas condiciones son enzimas que participan de los procesos metabólicos celulares fundamentales, como la degradación de hidratos de carbono a través de la vía EMP (glucoquinasa, *spot* 109 y fosfopiruvato hidratasa, *spots* 277 y 416), la transcripción (subunidad α de la ARN polimerasa, *spot* 222), la traducción (proteína ribosómica I10, *spot* 272 y factor de elongación Tu, *spot* 325), el metabolismo de nucleótidos (aspartato carbamoiltransferasa, *spot* 365) y el metabolismo heterofermentativo de azúcares a través de la vía PK (xilulosa 5-fosfato fosfocetolasa, enzima clave de la vía, *spot* 18) (Tabla 6.2).

Tabla 6.2 Descripción de proteínas de *L. reuteri* GR1 1101 expresadas a las 8 h de cultivo y separadas por 2D-PAGE.

| Nº de spot | Proteína | Código de acceso UniProt | E.C. | Función/Vía Metabólica | Longitud | Masa | Gen | Vol. Promedio / spot | | Expresión relativa |
|--|---|--------------------------|-----------|---|----------|-----------|-------------------|----------------------|--------------|--------------------|
| | | | | | | | | G | GF | |
| Sobre-expresadas en presencia de fructosa | | | | | | | | | | |
| 3 | Proteasa Clp dependiente de ATP | SEN3A7 | --- | Catalisis de la hidrólisis de enlaces peptídicos; interacción selectiva y no covalente con ATP | 745 aa | 82,29 kDa | <i>N134_00265</i> | 2136896,09 | 8474621,432 | 3,97 |
| 31 | Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa | B2G615 | 1.2.1.12 | Actividad oxidoreductasa y de unión a NAD | 335 aa | 35,99 kDa | <i>LAR_0381</i> | 21311778,37 | 35124175,88 | 1,65 |
| 34 | Factor de elongación Tu putativo | Q8KMM0 | --- | Actividad GTPasa (y factor de elongación durante la traducción) | 254 aa | 28,10 kDa | <i>tuf</i> | 4608505,718 | 7049448,117 | 1,53 |
| 37 | Fosfoglicerato mutasa dependiente de 2,3-difosfoglicerato | A5VHU4 | 5.4.2.11 | Cataliza la interconversión de 2-fosfoglicerato y 3-fosfoglicerato en la degradación de azúcares por la vía EM | 228 aa | 26,12 kDa | <i>gpmA</i> | 14682695,18 | 21659377,28 | 1,48 |
| Reprimidas en presencia de fructosa | | | | | | | | | | |
| 1 | Ornitina carbamoiltransferasa | F8DMA7 | 2.1.3.3 | La degradación de L-arginina a través de la vía ADI: L-arginina se convierte en ornitina y carbamoil-fosfato, el carbamoil-fosfato se convierte en amoníaco y CO ₂ con la consiguiente producción de ATP | 335 aa | 37,56 kDa | <i>argf</i> | 41690055,82 | 11503582,09 | 3,62 |
| 2 | Arginina deiminasa | A5VIN9 | 3.5.3.6 | Metabolismo de nucleótidos | 410 aa | 46,29 kDa | <i>arcA</i> | 9012371,267 | 1901120,478 | 4,74 |
| 12 | Purina nucleósido fosforilasa tipo deoD | A5VHR2 | 2.4.2.1 | Metabolismo de nucleótidos | 236 aa | 25,75 kDa | <i>deoD</i> | 7119088,59 | 2580877,492 | 2,76 |
| 17 | Acetaldehído-CoA/Alcohol deshidrogenasa bifuncional | A5VIB7 | --- | Utilización de carbono: metabolismo de fuentes de carbono alternativas como CO ₂ cuando se agotan las fuentes de carbono primarias; Metabolismo de alcoholes | 878 aa | 97,19 kDa | <i>Lreu_0321</i> | 5495114,035 | 2324830,692 | 2,36 |
| 24 | Alcohol deshidrogenasa conteniendo hierro | A5VMK5 | 1.1.1.6 | Metabolismo de glicerolpidos; Metabolismo de propanoato | 373 aa | 40,70 kDa | <i>Lreu_1840</i> | 7550119,487 | 3883985,287 | 1,94 |
| Expresadas en ambas condiciones | | | | | | | | | | |
| 109 | 2,5-diceto-D-ácido gluconico reductasa | S5NDP9 | 1.1.1.274 | Actividad oxidoreductasa | 287 aa | 32,43 kDa | <i>N134_10245</i> | 13610287,02 | 8634886,44 | 1,58 |
| 222 | Subunidad α de la ARN polimerasa dirigida por-DNA | R9WFD1 | 2.7.7.6 | Cataliza la transcripción de ADN a ARN | 293 aa | 31,21 kDa | <i>lr0247</i> | 22594846,67 | 27679939,94 | 1,23 |
| 272 | Proteína ribosómica I10 | Q38K83 | --- | Síntesis de macromoléculas constituyentes de ribosomas; ensamblaje y disposición de subunidades de ribosomas | 106 aa | 11,61 kDa | <i>lr0277</i> | 22786877,74 | 19605543,13 | 1,16 |
| 277 | Fosfopiruvato hidratasa (Enolasa) | B2G618 | 4.2.1.11 | Cataliza la conversión reversible de 2-fosfoglicerato en fosfoenolpiruvato, esencial para la degradación de azúcares a través de la Vía EM | 457 aa | 49,95 kDa | <i>eno</i> | 67244418,91 | 68691984,27 | 1,02 |
| 416 | Factor de elongación Tu | A5VJ92 | --- | Promover la unión dependiente de GTP de aminoacil-ARNt a ribosomas durante la traducción | 396 aa | 43,43 kDa | <i>tuf</i> | 29675981,2 | 32904500,95 | 1,11 |
| 329 | Xilulosa 5-fosfato fosfoctolasa | R9WEL7 | --- | Actividad aldehído-licasa; involucrada en la degradación de azúcares por la vía PK | 803 aa | 91,37 kDa | <i>LRL_0307</i> | 12528922,7 | 13831604,05 | 1,10 |
| 365 | Aspartato carbamoiltransferasa, subunidad catalítica | F8DRJ8 | 2.1.3.2 | Vía de biosíntesis <i>de novo</i> de UMP (uridina monofosfato); Metabolismo de pirimidina | 309 aa | 34,37 kDa | <i>pyrB</i> | 22117846,94 | 206255333,51 | 1,07 |

G: En medio CDM_G (control)

GF: En medio CDM_{GF} (control)

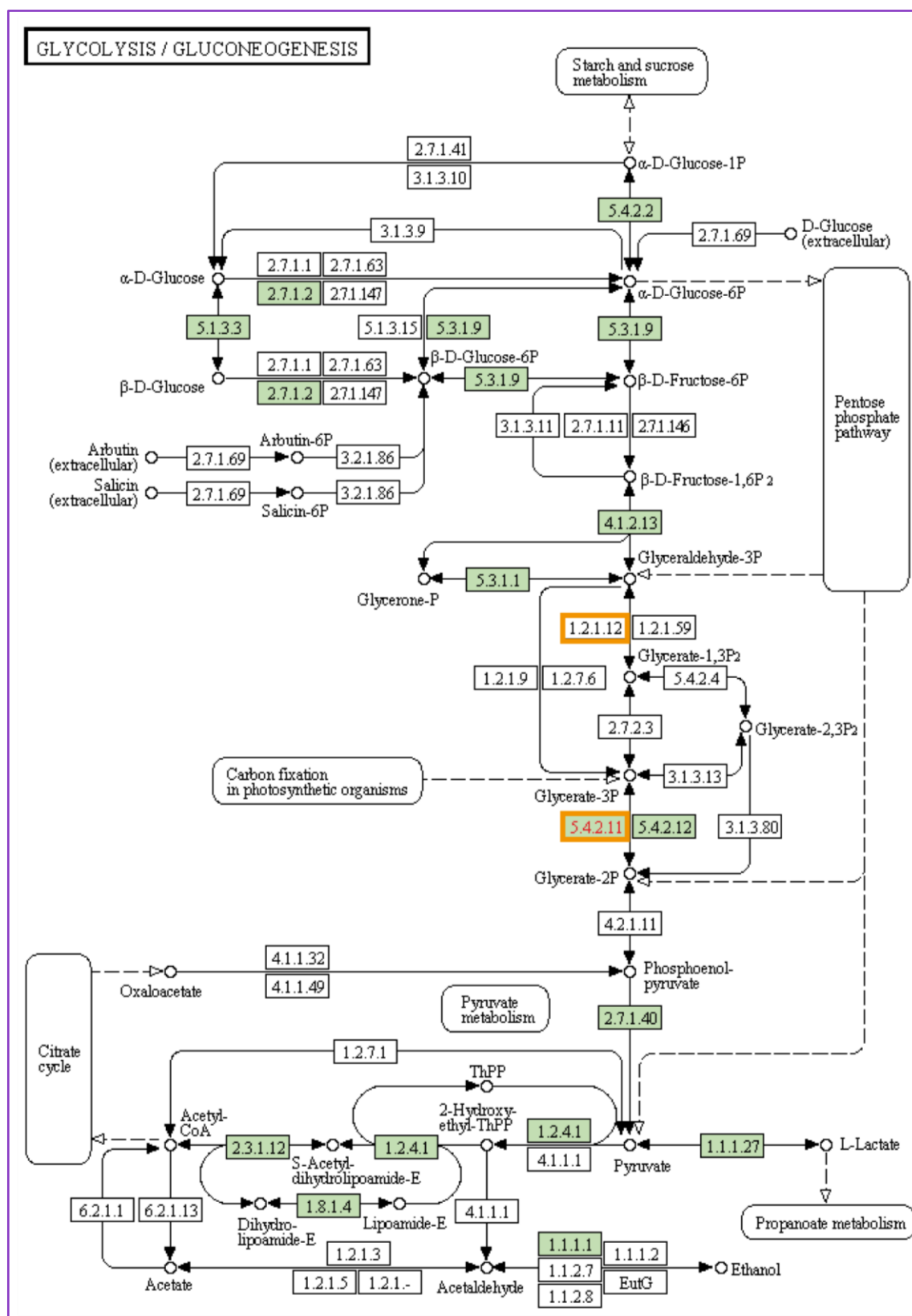


Figura 6.7 Esquema de la vía EMP (o glicólisis) tomada de la Base de Datos KEGG. Con recuadros de color naranja se indican las enzimas gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (E.C.: 1.2.1.12) y fosfoglicerato mutasa dependiente de 2,3-difosfoglicerato (E.C.: 5.4.2.11).

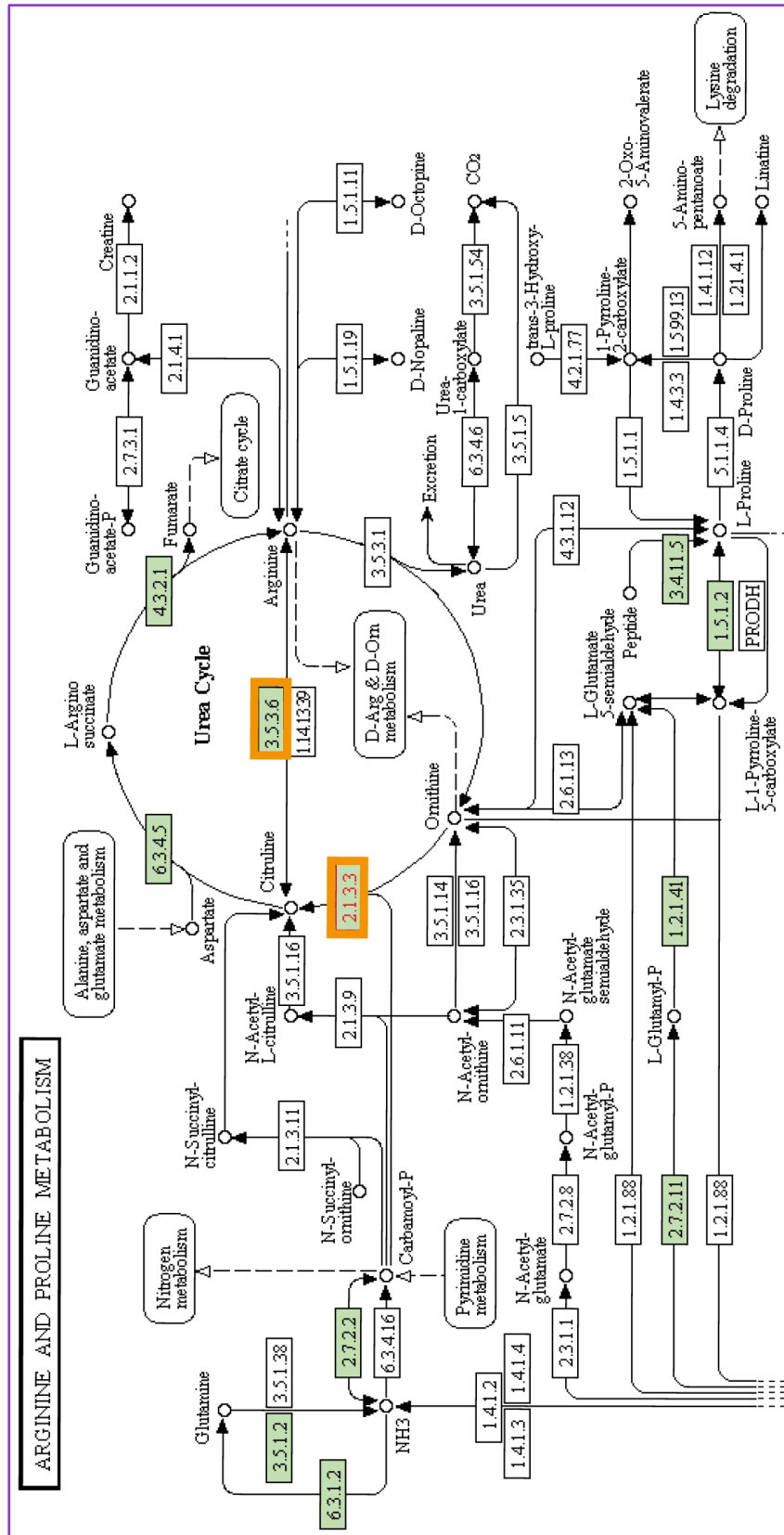
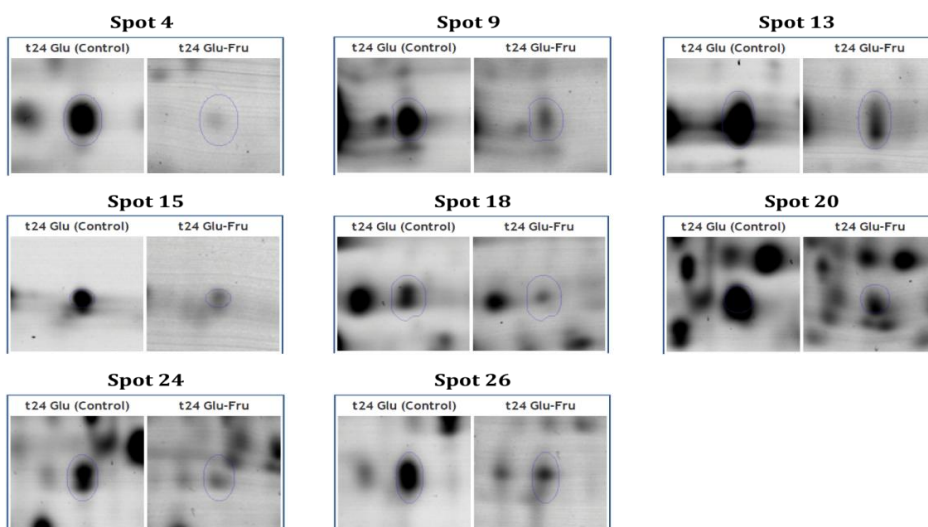


Figura 6.8 Esquema de la vía ADI, tomado de la Base de Datos KEGG. Con recuadros en color naranja se indican las enzimas ornitina carbamoyltransferasa (E.C.: 2.1.3.3) y arginina deiminasa (E.C.: 3.5.3.6).

En presencia de fructosa y a las 24 h de incubación del total de proteínas identificadas 8 resultaron reprimidas (*spots* 4, 9, 13, 15, 18, 20, 24 y 26) y solo 2 se expresaron en ambas condiciones (*spots* 82 y 193) (Figura 6.9). En la Tabla 6.3 se muestran los resultados del análisis cualitativo por espectrometría de masas de los *spots* identificados, las diferentes funciones asignadas y la cuantificación relativa de la expresión diferencial de proteínas por densitometría. Entre las proteínas reprimidas se destacan la 1,3-propanediol deshidrogenasa (*spot* 9) que participa en el metabolismo del glicerol, la glicerol deshidrogenasa (*spot* 18) —que también se encuentra reprimida a las 8 h (*spot* 24)— y dos enzimas que participan del metabolismo de azúcares por la vía PK: la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (*spot* 13) y la glucosa 6-fosfato 1-deshidrogenasa (*spot* 15). Esta vía se expresó constitutivamente a las 8 h. En la Figura 6.10 se muestra un esquema de la vía PK (base de datos *KEGG*, http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?lre00030+Lreu_1766) y las reacciones que catalizan las enzimas mencionadas. Dos proteínas fueron expresadas en ambas condiciones a las 24 h: proteína ribosómica I10 (*spot* 82) y el factor de elongación Tu (*spot* 193), enzimas que participan en el proceso de traducción. Estas enzimas coincidieron con 2 *spots* identificados a las 8 h cuya expresión también se observó en ambas condiciones (*spots* 272 y 325).

a) Spots reprimidos en presencia de fructosa



b) Spots expresados en ambas condiciones

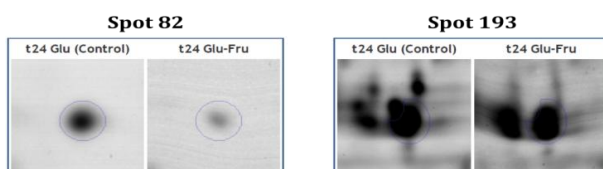


Figura 6.9 Porciones de geles bidimensionales donde se muestran los *spots* reprimidos en presencia de fructosa (a) y aquellos expresados en ambas condiciones (b) a las 24 h de incubación. El *spot* considerado en cada caso se indica con una línea azul.

Tabla 6.3 Descripción de proteínas de *L. reuteri* CRL 1101 expresadas a las 24 h de cultivo y separadas por 2DE-PAGE.

| Nº de spot | Proteína | Código de acceso UniProt | E.C. | Función/Vía metabólica | Longitud | Masa | Gen | Vol. promedio/spot | | Expresión relativa |
|--|---|--------------------------|-----------|---|----------|-----------|------------------|--------------------|-------------|--------------------|
| | | | | | | | | G | GF | |
| Reprimidas en presencia de fructosa | | | | | | | | | | |
| 4 | Histidina descarboxilasa, tipo piruvilo | A5VMJ7 | 4.1.1.22 | Metabolismo de histidina, catálisis de la reacción: L-histidina <=> histamina + CO ₂ | 311 aa | 34,08 kDa | <i>Lreu_1832</i> | 17742562,30 | 6949353,37 | 2,55 |
| 9 | 1,3-propanediol deshidrogenasa (alcohol deshidrogenasa conteniendo hierro) | A5VHI2 | 1.1.1.202 | Degradación de glicerol; cataliza la conversión de 3-hidroxi-propanol-1 debido a 1,3-propanodiol, regenerando NAD ⁺ , lo que permite la producción de acetato sobre etanol y la ganancia de 1 ATP durante el crecimiento en glucosa. | 390 aa | 42,18 kDa | <i>Lreu_0030</i> | 14309580,24 | 6962196,11 | 2,06 |
| 13 | 6-fosfogluconato deshidrogenasa | A5VMD1 | 1.1.1.44 | Cataliza la descarboxilación oxidativa de 6-fosfogluconato a ribulosa 5-P y CO ₂ , con la consiguiente reducción de NADP a NADPH | 478 aa | 53,40 kDa | <i>Lreu_1766</i> | 31319817,47 | 15536931,59 | 2,02 |
| 15 | Glucosa-6-fosfato 1-deshidrogenasa | A5VMD0 | 1.1.1.49 | Cataliza la oxidación de la glucosa 6-fosfato en 6-fosfogluconolactona | 493 aa | 56,37 kDa | <i>Lreu_1765</i> | 5468230,47 | 2786091,23 | 1,96 |
| 18 | Alcohol deshidrogenasa conteniendo hierro (Glicerol deshidrogenasa) | A5VMK5 | 1.1.1.6 | Metabolismo de glicerolípidos; Metabolismo de propanoato | 373 aa | 40,70 kDa | <i>Lreu_1840</i> | 13976799,92 | 7273070,19 | 1,92 |
| 20 | D-lactato deshidrogenasa | A5VLZ7 | 1.1.1.28 | Metabolismo de azúcares | 330 aa | 36,57 kDa | <i>Lreu_1631</i> | 13010665,14 | 6885156,12 | 1,89 |
| 24 | Difosfatasa inorgánica | A5VJM5 | 3.6.1.1 | Fosforilación oxidativa, cataliza la reacción: difosfato + H ₂ O <=> H ⁺ + 2 fosfato | 311 aa | 34,20 kDa | <i>Lreu_0785</i> | 12464973,00 | 7525073,59 | 1,66 |
| 26 | Inosina-uridina nucleósido hidrolasa (Ribonucleósido hidrolasa no específica) | R9WJN3 | 3.2.-.- | Actividad hidrolasa no específica | 302 aa | 32,54 kDa | <i>LRL1857</i> | 13140926,26 | 8082997,90 | 1,63 |
| Expresadas en ambas condiciones | | | | | | | | | | |
| 82 | Proteína ribosómica I10 | Q38K83 | --- | Síntesis de macromoléculas constituyentes de ribosomas, montaje y disposición de subunidades de ribosomas | 106 aa | 11,61 kDa | <i>I-r0277</i> | 10959165,36 | 6931849,53 | 1,58 |
| 193 | Factor de elongación Tu | A5VJ92 | --- | Promover la unión dependiente de GTP de aminoacil-tRNA a ribosomas durante la traducción | 396 aa | 43,43 kDa | <i>tuf</i> | 30885478,20 | 24597640,03 | 1,26 |

G: En medio CDM_c (control)

GF: En medio CDM_{GF}

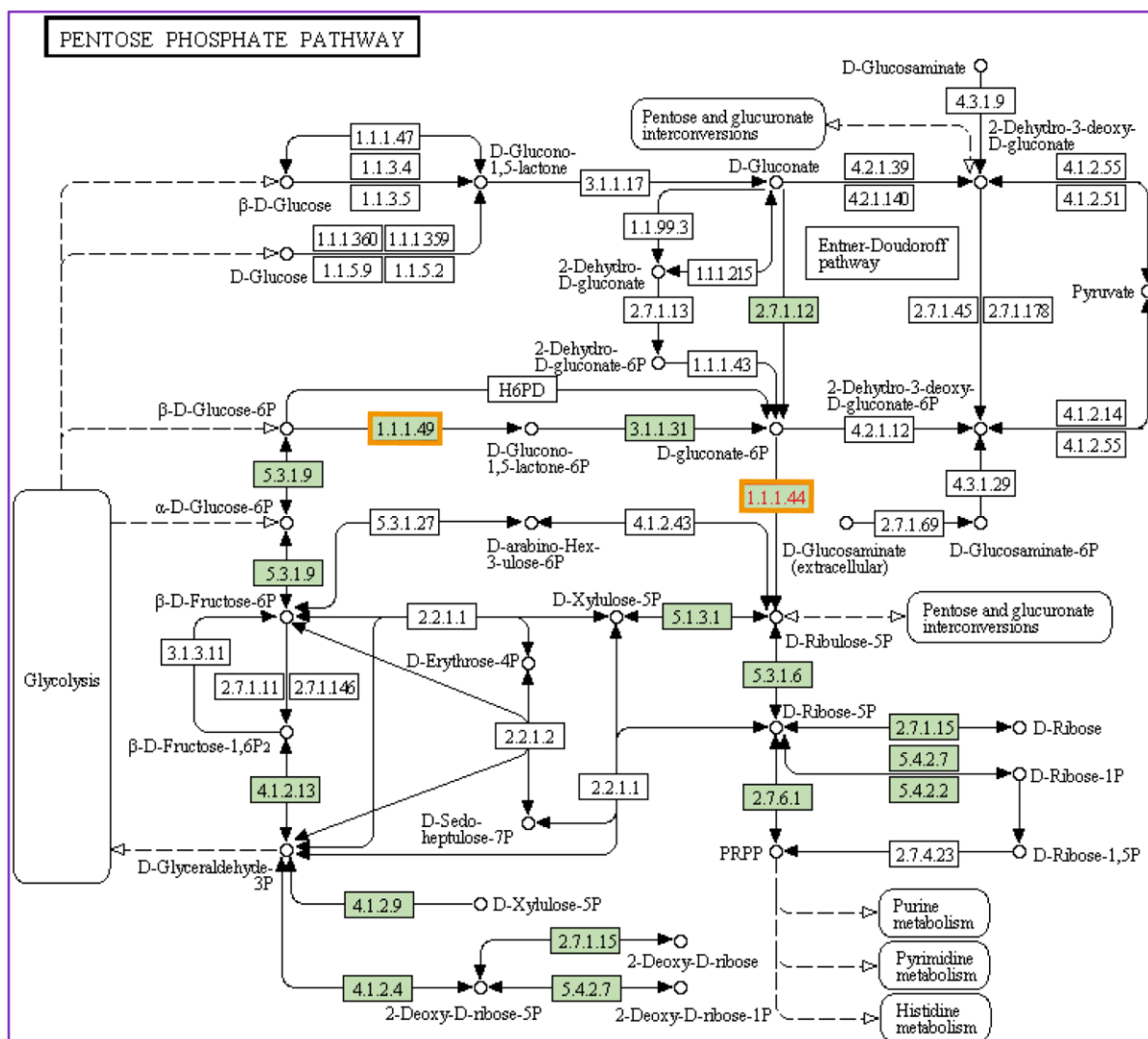


Figura 6.10 Esquema de la vía PK (o de las pentosas fosfato), tomado de la Base de Datos *KEGG*. Con recuadros de color naranja se indican las enzimas 6-fosfogluconato deshidrogenasa (E.C.: 1.1.1.44) y la glucosa 6-fosfato 1-deshidrogenasa (E.C.: 1.1.1.49).

6.3. DISCUSIÓN

En este capítulo se estudió la actividad de la enzima MDH en presencia y ausencia de fructosa —sustrato para la síntesis de manitol— y se puso a punto un procedimiento de transcripción reversa acoplada a PCR cuantitativa (RT-qPCR) para cuantificar los niveles de transcripción del gen *mdh* de *L. reuteri* CRL 1101 en condiciones de producción de manitol (presencia de fructosa) vs condiciones de no producción (ausencia de fructosa). Por otra parte, mediante electroforesis bidimensional se analizó la expresión diferencial de proteínas intracelulares de *L. reuteri* CRL 1101 en presencia y ausencia de fructosa y en función del tiempo de incubación.

A la fecha, la purificación y/o caracterización de la enzima MDH y la expresión heteróloga del gen *mdh* se estudiaron en diferentes BL como *L. brevis*, *Leuc. mesenteroides*, *Leuc. pseudomesenteroides*, *L. reuteri*, *L. intermedius* y *L. sanfranciscensis* (Martinez y col., 1963; Aarnikunnas y col., 2002; Hahn y col., 2003; Korakli y Vogel, 2003; Saha, 2004; Sasaki y col., 2005). Sin embargo, no existen estudios comparativos de la actividad enzimática y de la expresión del gen *mdh* en presencia y ausencia del inductor (fructosa) y en función del tiempo de incubación en BL. En este trabajo de Tesis se presenta una evaluación detallada de la actividad enzimática y de la expresión relativa del gen *mdh* durante el crecimiento de *L. reuteri* CRL 1101 en presencia y ausencia de fructosa. La enzima MDH de *L. reuteri* CRL 1101 se expresa de manera constitutiva en ausencia de fructosa mostrando niveles basales de actividad (~ 0,5 U/mg prot) a lo largo de la fermentación. Esta actividad enzimática es fuertemente inducida por fructosa durante los primeros estadios del crecimiento microbiano, observándose un valor de actividad 6 veces mayor ($3,0 \pm 0,2$ U/mg prot) respecto al control (sin fructosa) a las 8 h de incubación utilizando un medio químicamente definido (CDM). Este medio de cultivo es apropiado para estudios de actividad enzimática y expresión génica ya que permite conocer con exactitud la composición del mismo, dando información sobre la presencia o ausencia de inductores o inhibidores del gen de interés. En general, los valores de actividad de MDH obtenidos en esta Tesis en los extractos crudos de *L. reuteri* CRL 1101 fueron más altos que los obtenidos en extractos crudos de otras BL heterofermentativas, como *L. intermedius* NRRL B-3693 (0,99 U/mg prot; Saha,

2004), *L. sanfranciscensis* TMW1.392 (1,0 U/mg prot; Korakli y Vogel, 2003) o *Leuc. mesenteroides* (0.68 U/mg prot; Aarnikunnas y col., 2002). Por el contrario, Hahn y col. (2003) informaron un valor de actividad MDH 5 veces mayor (15,0 U/mg prot) que los presentados aquí, en extractos crudos de la cepa *Leuc. pseudomesenteroides* ATCC 12291.

En este trabajo de Tesis se utilizó la técnica de transcripción reversa acoplada a PCR cuantitativa (RT-qPCR) para cuantificar los niveles de ARNm del gen *mdh* de *L. reuteri* CRL 1101 en condiciones de producción de manitol vs condiciones de no producción. En esta BL el gen *mdh* se expresa de manera constitutiva en ausencia de fructosa mientras que su expresión se regula positivamente en presencia de fructosa, aumentando más de 40 veces en fase logarítmica respecto al control. En esta fase de crecimiento se observa una correlación entre los mayores niveles de expresión del gen *mdh* y la máxima actividad de la enzima MDH, lo que sugiere que la regulación de la expresión génica ocurre durante el proceso de transcripción (síntesis de ARNm). No se han encontrado trabajos que describan estudios de expresión de genes involucrados en el metabolismo de manitol en BL; la mayoría de los estudios de este tipo se realizaron en otros microorganismos, principalmente en hongos. Por ejemplo en *Alternaria brassicicola* –hongo patógeno de plantas– se exploró la participación del manitol en la patogenicidad del hongo y en la protección de las células fúngicas contra compuestos vegetales de defensa (isotiocianatos, ITC) (Calmes y col., 2013). Se estudiaron dos genes clave en el metabolismo del manitol en hongos: *mpd* que codifica para la enzima manitol 1-P deshidrogenasa (MPD, cataliza la conversión de fructosa-6-P a manitol-1-P) y *mdh* que codifica para la enzima MDH (cataliza la reducción de fructosa a manitol). Aplicando qPCR se estudió la expresión relativa de estos genes antes y después de 24 h de exposición a ITC. Se observó que la expresión relativa del gen *mpd* se mantuvo invariable mientras que la del gen *mdh* aumentó 3 veces, proponiéndose que el manitol participa en la protección fúngica contra el estrés oxidativo generado por la exposición a ITC.

Por otro lado, el manitol es uno de los principales solutos compatibles del hongo *Neosartorya (N.) fischeri (A. fischeri)* y se acumula en conidios (esporas asexuales) y

ascosporas (esporas sexuales). Un estudio reciente reveló que la biosíntesis de este polirol en *N. fischeri* depende principalmente de la acción de la enzima MPD: mediante ensayos de qPCR se demostró que el gen *mpd* se expresa moderadamente en hifas vegetativas y conidióforos, mientras que se sobre-expresa durante el desarrollo de ascosporas bajo condiciones de estrés oxidativo o por calor. La supresión del gen *mpd* redujo la producción de manitol en un 85% pero no afectó el crecimiento del micelio independientemente del tipo de estrés aplicado. Sin embargo, la reducción en la producción de manitol tuvo un efecto negativo sobre la formación normal de los ascosporos. Cabe destacar que los conidios de la cepa mutante carente del gen *mpd* produjeron menor cantidad de manitol y fueron más sensibles al estrés oxidativo y por calor (Wyatt y col., 2014).

La aplicación de qPCR para el análisis de genes relacionados con la producción de manitol también se llevó a cabo en la ameba *Acanthamoeba castellanii* (Bínová y col., 2012). En el genoma de este microorganismo se identificaron los genes de las enzimas MPD y MDH, claves en el metabolismo del manitol y —de la misma manera que ocurre en hongos— se sugirió que el manitol podría cumplir un rol en la tolerancia al estrés (Watkins y Gray, 2008). En un trabajo posterior y mediante el uso de RT-qPCR, se compararon los niveles de ARNm de estas enzimas durante las reacciones de respuesta al estrés (formación de quistes y pseudoquistes). El análisis detallado de las secuencias de ARNm de ambos genes reveló similitudes con diversas alcohol deshidrogenasas más que con manitol deshidrogenasas. Además, no se detectó manitol en ninguna etapa del ciclo de vida de la ameba, sugiriendo que el manitol no cumple ningún rol protector en este organismo (Bínová y col., 2012).

En los últimos años la técnica de qPCR se aplicó ampliamente para el estudio de BL en alimentos, principalmente en productos lácteos, como por ejemplo para la cuantificación de *Lc. lactis* en quesos blandos (Achilleos y Berthier, 2013) o para la detección rápida de la composición microbiana en yogur (Miller y col., 2012) y en quesos duros y semi-duros (Falentin y col., 2010; 2012; Bottari y col., 2013; Ganesan y col., 2014). Por otro lado, se utilizó esta técnica para la detección y cuantificación de los géneros *Pediococcus*, *Lactobacillus* y *Oenococcus* en sidra (Ibarburu y col., 2010).

En lo que respecta a los estudios de la expresión diferencial de proteínas intracelulares de *L. reuteri* CRL 1101 desarrollados en el presente trabajo de Tesis, se demostró que durante la fase logarítmica de crecimiento se expresan de manera constitutiva (en presencia y ausencia de fructosa) enzimas que participan en los procesos metabólicos celulares básicos, entre ellos el metabolismo de azúcares a través de las vías EMP y PK. Esto supone que, bajo determinadas condiciones, *L. reuteri* no actuaría como una especie heterofermentativa obligada (que solo posee la vía PK de degradación de azúcares) tal como fue descrito por Salvetti y col. (2013) sino que se comportaría como una especie heterofermentativa facultativa. Existen algunas evidencias que sustentan esta hipótesis; al respecto, estudios realizados en *L. reuteri* ATCC 55730 indican que cuando se cultiva en presencia de glucosa, la cepa utiliza tanto la vía PK como la vía EMP y produce ácido láctico y etanol como principales productos finales de fermentación (Årsköld y col., 2008). Sin embargo, el crecimiento en glucosa es limitado debido a un desequilibrio en el balance redox resultando en una mayor formación de etanol que de acetato. La presencia de un aceptor externo de electrones como la fructosa permite la formación de manitol y restaura el equilibrio redox, resultando en la formación de acetato, lo cual es energéticamente más favorable ya que permite la ganancia de un mol de ATP y por lo tanto un mayor crecimiento y producción de biomasa. Estas observaciones fueron confirmadas por otros autores quienes, a partir de comparaciones de los transcriptomas de las cepas de *L. reuteri* ATCC 55730 y ATCC 6475, demostraron que ambas vías están activas durante las fases de crecimiento logarítmica y estacionaria (Saulnier y col., 2011). En un estudio reciente con la cepa ATCC 55730 se demostró mediante ingeniería metabólica que aumentando el flujo a través de la vía EMP se mejoró la capacidad de la cepa para metabolizar elevadas concentraciones de glucosa (Papagianni y Legisa, 2014).

Otro aceptor de electrones adecuado para la restauración del balance redox además de la fructosa es el 3-hidroxi propionaldehído (3-HPA), que puede convertirse en 1,3-propanediol en una reacción catalizada por la enzima 1,3-propanediol deshidrogenasa, regenerando así una molécula de NAD⁺. Se ha demostrado que esta enzima desempeña un papel fundamental en la conversión de 3-HPA en células de *L. reuteri* en fase de crecimiento exponencial (Stevens y col., 2011). Nuestros resultados están en

concordancia con estos hallazgos ya que la enzima responsable de esta conversión se encontró reprimida (*spot* 9, Tabla 6.3) en fase estacionaria en presencia de fructosa.

Existen escasos trabajos sobre expresión diferencial de proteínas en *L. reuteri*. Un ejemplo de ello es el estudio de la tolerancia de *L. reuteri* ATCC 23272 a sales biliares. La electroforesis bidimensional permitió identificar 28 proteínas involucradas en el metabolismo de carbohidratos, transcripción y traducción, metabolismo de nucleótidos y aminoácidos, respuesta a estrés y reacciones de oxido-reducción, mostrando que las sales biliares inducen una respuesta fisiológica compleja (Lee y col., 2008a). También se estudió la tolerancia de esta cepa a valores bajos de pH (5,0; 4,5 y 4,0) y se identificaron 40 proteínas comunes cuya expresión se alteró de manera significativa en los tres valores de pH estudiados. Estas proteínas estuvieron relacionadas a alguna de las siguientes funciones: i) unión y transporte, ii) transcripción/traducción, iii) metabolismo de nucleótidos y biosíntesis de aminoácidos, iv) metabolismo de carbono y energía, y v) regulación del pH y estrés (Lee y col., 2008b). Otro ejemplo es el estudio del comportamiento de *L. reuteri* Lb2 BM-DSM 16143 en presencia de selenio (Se) —oligoelemento importante implicado en la protección celular frente al estrés oxidativo—. Se utilizó una condición de estimulación (presencia de Se) y una condición control (ausencia de Se) y se identificaron 25 proteínas involucradas en los siguientes procesos: i) metabolismo de Se; ii) metabolismo de energía; iii) estrés/adhesión; y iv) morfología celular y transporte (Lamberti y col., 2011). En un trabajo posterior se abordó el estudio de la incorporación de Se en proteínas solubles de esta cepa (Galano y col., 2013). Mediante electroforesis bidimensional y espectrometría de masas se detectaron 10 proteínas enriquecidas en selenio y se demostró que este oligoelemento se incorporó exclusivamente como selenocisteína.

Si bien la enzima MDH de *L. reuteri* CRL 1101 no fue identificada mediante estudios proteómicos, esto no significa que no se haya expresado en las condiciones estudiadas, probablemente el *spot* correspondiente a dicha enzima no fue seleccionado durante la elección de los *spots* para su posterior identificación por espectrometría de masas. En este sentido es importante mencionar que i) el programa *Prodigy SameSpot* utilizado para el análisis de los proteomas obtenidos en las distintas condiciones detectó

alrededor de 300 *spots* presentes en cada uno de los geles bidimensionales, ii) de los 300 *spots* por gel, solo el 10% (~30 *spots*) mostró una expresión diferencial estadísticamente significativa ($p > 0,005$), y iii) se seleccionaron 36 *spots* en total, provenientes de las 2 condiciones estudiadas (es decir 18 *spots* en promedio por condición). Por lo expuesto, es muy probable que la enzima MDH se haya expresado en el proteoma de *L. reuteri* CRL 1101 en las condiciones estudiadas pero desafortunadamente no pudo ser evaluada y posteriormente identificada por espectrometría de masas.

6.4. CONCLUSIONES PARCIALES

- La producción de manitol y la actividad manitol 2-deshidrogenasa son fuertemente inducidas por fructosa durante los primeros estadios de crecimiento de *L. reuteri* CRL 1101 tanto en medio complejo (MRS) como en medio químicamente definido (CDM).
- La enzima MDH muestra niveles basales de actividad a lo largo de la fermentación en ausencia de fructosa. Esta enzima se induce en presencia de fructosa, observándose un valor de actividad 6 veces mayor respecto al control (sin fructosa) a las 8 h de incubación en CDM.
- El gen *mdh* de *L. reuteri* CRL 1101 se expresa de manera constitutiva en ausencia de fructosa, siendo 6 veces mayor en fase estacionaria respecto de la fase logarítmica. La presencia de fructosa regula positivamente la expresión de *mdh* aumentando su expresión 42 y 16 veces respecto al control en fase logarítmica y estacionaria, respectivamente.
- Se observó una correlación entre los niveles de expresión del gen *mdh* y la actividad de la enzima MDH sugiriendo que la regulación de la expresión génica ocurre principalmente a nivel transcripcional (síntesis de ARNm).
- En condiciones de producción de manitol (presencia de fructosa), se expresaron diferencialmente 37 y 38 proteínas en fase logarítmica y en fase estacionaria, respectivamente, de las cuales se sobre-expresaron 15 y 16 proteínas, respectivamente, mientras que 22 proteínas se regularon negativamente en ambos casos.
- Durante la fase logarítmica de crecimiento se expresan de manera constitutiva enzimas que participan en los procesos metabólicos celulares fundamentales como el metabolismo de azúcares a través de las vías EMP y PK, la transcripción, la traducción y el metabolismo de nucleótidos. En fase estacionaria el proceso de traducción continúa activo de manera constitutiva.

- La presencia de fructosa durante la fase logarítmica provoca la activación del catabolismo de azúcares por la vía EMP y la represión de la degradación de la L-arginina a través de la vía ADI y de la vía de degradación de glicerolípidos.
- La presencia de fructosa durante la fase estacionaria genera la represión de la vía de degradación de glicerolípidos —también reprimida en fase logarítmica— y de la vía PK de degradación de azúcares, que se expresa en fase logarítmica.

CONCLUSIONES

Hay hombres que de su ciencia
tienen la cabeza llena;
hay sabios de todas menas,
mas digo, sin ser muy ducho:
es mejor que aprender mucho
el aprender cosas buenas.

José Hernández (1834 - 1886)

CONCLUSIONES GENERALES

A partir del análisis de los resultados obtenidos en el presente trabajo de Tesis Doctoral se llegó a las siguientes conclusiones:

- El manitol es un metabolito asociado al crecimiento de *L. reuteri* CRL 1101 en presencia de fructosa. Su síntesis se inicia durante la fase lag o logarítmica de crecimiento y se prolonga hasta las 24 h; el incremento del tiempo de fermentación hasta las 48 o 72 h no provoca aumentos significativos en la producción del polirol.
- La melaza de caña de azúcar es un sustrato adecuado para la producción de manitol por *L. reuteri* CRL 1101. La máxima concentración de manitol se encontró usando 7,5% de azúcares totales. El incremento en la concentración de azúcares (10,0%, p/v) no produjo aumentos significativos en la producción de manitol.
- Para favorecer la formación de manitol, la fructosa (sustrato de síntesis de manitol) debe estar disponible desde el inicio de la fermentación. El incremento (10 a 2000 veces) en la biomasa inicial (0,001 g/L) no mejora la producción de manitol en las condiciones estudiadas a las 24 h.
- Dependiendo del pH del medio de cultivo, *L. reuteri* CRL 1101 utiliza la fructosa como sustrato de fermentación y como aceptor alternativo de electrones (pH 6,0) o solo como aceptor alternativo de electrones para la síntesis de manitol (pH 5,0 y pH libre).
- Se formuló el medio de cultivo minimizado MLC que contiene (p/v) 7,5% de azúcares de melaza; 0,5 % de extracto de levadura y 1,0% de extracto de carne para la producción de manitol por *L. reuteri* CRL 1101.

- La máxima producción de manitol por esta cepa fue de 228 ± 6 mM (42 ± 1 g/L), obtenida en medio MLC a pH 5,0 a las 24 h de incubación, siendo ésta la mayor producción de manitol obtenida por una cepa salvaje de *L. reuteri* a la fecha. En estas condiciones también se obtuvo la mayor productividad volumétrica ($1,73 \pm 0,05$ g/L h) y una eficiencia de conversión óptima (Y_{Mtl} : 105%).
- Se determinó que las condiciones de cultivo óptimas para producción de manitol por *L. reuteri* CRL 1101 son: medio minimizado MLC, agitación (100 rpm), biomasa inicial de 0,001 g/L, pH 5,0, 37 °C y 24 h de incubación.
- La enzima MDH —responsable de la reducción de fructosa a manitol— muestra niveles basales de actividad a lo largo de la fermentación tanto en medio complejo (MRS) como en medio químicamente definido (CDM). La producción de manitol y la actividad MDH son fuertemente inducidas por fructosa durante los primeros estadios de crecimiento de *L. reuteri* CRL 1101 en ambos medios.
- El gen *mdh* —que codifica para la enzima MDH— se expresa de manera constitutiva en ausencia de fructosa. La presencia de fructosa regula positivamente su expresión. La correlación entre los niveles de expresión del gen *mdh* y la actividad de la enzima MDH sugiere que la regulación de la expresión génica ocurre principalmente a nivel transcripcional.
- En condiciones de producción de manitol (presencia de fructosa) y durante la fase logarítmica de crecimiento se expresan enzimas que participan en los procesos celulares fundamentales como metabolismo de azúcares (a través de las vías PK y EMP), transcripción, traducción y metabolismo de nucleótidos. En estas condiciones se activa el catabolismo de azúcares por la vía EMP. Esto demuestra que *L. reuteri* CRL 1101 posee y expresa los genes para metabolizar azúcares por ambas vías, por lo que se comportaría como una BL heterofermentativa facultativa.

PROYECCIONES

Como proyecciones de este trabajo de tesis se plantean realizar los siguientes estudios:

- Evaluar la producción de manitol en cultivos con mayor velocidad de agitación: 300, 600 y 900 rpm.
- Incrementar la producción de manitol mediante la construcción de cepas mutantes de *L. reuteri* CRL 1101 utilizando dos estrategias:
 - a) la sobre-expresión del gen *mdh*
 - b) la delección de los genes que codifican para las enzimas alcohol deshidrogenasa y/o lactato deshidrogenasa
- Evaluar la producción de manitol en bioreactor a mayor escala en condiciones de cultivo optimizadas como base para su producción industrial.
- Aislar el manitol producido mediante la obtención de cristales de mayor tamaño y poner a punto el proceso de purificación posterior (separación, lavado y secado).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Creo que parte de mi amor a la vida se lo debo a mi amor a
los libros.

Adolfo Bioy Casares (1914 - 1999)

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aarnikunnas J, Rönholm K, Palva A (2002) The mannitol dehydrogenase gene (*mdh*) from *Leuconostoc mesenteroides* is distinct from other known bacterial *mdh* genes. *Appl Microbiol Biotechnol* 59:665-671.
- Achilleos C, Berthier F (2013) Quantitative PCR for the specific quantification of *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus paracasei* and its interest for *Lactococcus lactis* in cheese samples. *Food Microbiol* 36:286-295.
- Adachi O, Toyama H, Matsushita K (1999) Crystalline NADP-dependent D-mannitol dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans*. *Biosci Biotechnol Biochem* 63:402-407.
- Akinterinwa O, Khankal R, Cirino PC (2008) Metabolic engineering for bioproduction of sugar alcohols. *Curr Opin Biotech* 19:461-467.
- Altaf M, Venkateshwar M, Srijana M, Reddy G (2007) An economic approach for L-(+) lactic acid fermentation by *Lactobacillus amylophilus* GV6 using inexpensive carbon and nitrogen sources. *J Appl Microbiol* 103:372-380.
- Årsköld E, Lohmeier-Vogel E, Cao R, Roos S, Rådström P, van Niel EWJ (2008) Phosphoketolase pathway dominates in *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 containing dual pathways for glycolysis. *J Bacteriol* 190:206-212.
- Bae S, Shoda M (2004) Bacterial cellulose production by fed-batch fermentation in molasses medium. *Biotechnol Prog* 20:1366-1371.
- Baek H, Song KH, Park SM, Kim SY, Hyun HH (2003) Role of glucose in the bioconversion of fructose into mannitol by *Candida magnoliae*. *Biotechnol Lett* 25:761-765.
- Bahador A, Lesan S, Kashi N (2012) Effect of xylitol on cariogenic and beneficial oral streptococci: a randomized, double-blind crossover trial. *Iran J Microbiol* 4:75-81.
- Barker SA, Gómez-Sánchez A, Stacey M (1958) Studies of *Aspergillus niger*. X. Polyol and disaccharide production from acetate. *J Chem Soc* 52:2583-2586.

- Bäumchen C, Roth AHFJ, Biedendieck R, Malten M, Follmann M, Sahm H, Bringer-Meyer S, Jahn D (2007) D-Mannitol production by resting state whole cell biotransformation of D-fructose by heterologous mannitol and formate dehydrogenase gene expression in *Bacillus megaterium*. *Biotechnol J* 2:1408-1416.
- Benson FR (1978) Alcohols, polyhydric (Sugar). In *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, Grayson M and Eckroth D (Eds.) 3rd Ed., Vol 1. John Wiley & Sons Inc., New York, USA, pp. 754-778.
- Bernt WO, Borzelleca JF, Flamm G, Murno IC (1996) Erythritol: a review of biological and toxicological studies. *Regul Toxicol Pharmacol* 24:S191-S197.
- Bínová E, Kliesciková J, Ashford DA, Thomas-Oates J, Nohýnková E (2012) Mannitol is not involved in protective reactions of *Acanthamoeba*. *Mol Biochem Parasit* 184:118-121.
- Blair EB, Emerson JS, Tull AH (1967) A new medium, salt mannitol plasma agar, for the isolation of *Staphylococcus aureus*. *Am J Clin Pathol* 47:30-39.
- Bobillo M, Marshall VM (1991) Effect of salt and culture aeration on lactate and acetate production by *Lactobacillus plantarum*. *Food Microbiol* 8:153-160.
- Bottari B, Agrimonti C, Gatti M, Neviani E, Marmiroli N (2013) Development of a multiplex real time PCR to detect thermophilic lactic acid bacteria in natural whey starters. *Int J Food Microbiol* 160:290-297.
- Brown TL, LeMay HE, Bursten BE (1998) Termoquímica. En *Química. La Ciencia Central*, Vázquez PER (Ed.) 7th Ed. Prentice Hall, DF, México, pp. 145-181.
- Brünker P, Altenbuchner J, Kulbe KD, Mattes R (1997) Cloning, nucleotide sequence and expression of mannitol dehydrogenase gene from *Pseudomonas fluorescens* DSM 50106 in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 1351:157-167.
- Budavari S, O'Neil MJ, Smith A, Heckelman PE, Kinneary JF (1996) The Merck Index. An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. 12th Ed. Merck Research Laboratories, Division of Merck & Co. Inc., Whitehouse Station, New Jersey, USA.
- Burger A, Henck JO, Hetz S, Rollinger JM, Weissnicht AA, Stöttner H (2000) Energy/temperature diagram and compression behavior of the polymorphs of D-mannitol. *J Pharm Sci* 89:457-468.

- Calmes B, Guillemette T, Teyssier L, Siegler B, Pigné S, Landreau A, Iacomi B, Lemoine R, Richomme P, Simoneau P (2013) Role of mannitol metabolism in the pathogenicity of the necrotrophic fungus *Alternaria brassicicola*. *Front Plant Sci* 4:131.
- Campos DCP, Santos AS, Wolkoff DB, Matta VM, Cabral LMC, Couri S (2002) Cashew apple juice stabilization by microfiltration. *Desalination* 148:61-65.
- Candiano G, Bruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri GM, Carnemolla B, Orecchia P, Zardi L, Righetti PG (2004) Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* 25:1327-1333.
- Carvalho F, Moniz P, Duarte LC, Esteves MP, Gírio FM (2011) Mannitol production by lactic acid bacteria grown in supplemented carob syrup. *J Ind Microbiol Biotechnol* 38:221-227.
- Ceccaroli P, Saltarelli R, Cesari P, Pierleoni R, Sacconi C, Vallorani L, Rubini P, Stocchi V, Martin F (2003) Carbohydrate and amino acid metabolism in *Tuber borchii* mycelium during glucose utilization: a (¹³C) NMR study. *Fungal Genet Biol* 39:168-175.
- Champomier-Vergès MC, Zagorec M, Fadda S (2010) Proteomics: A Tool for Understanding Lactic Acid Bacteria Adaptation to Stressful Environments. In *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications*, Mozzi F, Raya RR and Vignolo GM (Eds.) Wiley-Blackwell, Oxford, UK.
- Chaturvedy V, Bartiss A, Wong B (1997) Expression of bacterial *mtlD* in *Saccharomyces cerevisiae* results in mannitol synthesis and protects a glycerol-defective mutant from high-salt and oxidative stress. *J Bacteriol* 179:157-162.
- Cook GM, Russell JB (1994) The effect of extracellular pH and lactic acid on pH homeostasis in *Lactococcus lactis* and *Streptococcus bovis*. *Curr Microbiol* 28:165-168.
- Costenoble R, Adler L, Niklasson C, Liden G (2003) Engineering of the metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* for anaerobic production of mannitol. *FEMS Yeast Res* 3:17-25.
- Cummings JH, Stephen AM (2007) Carbohydrate terminology and classification. *Eur J Clin Nutr* 61:5-18.
- De Man JC, Rogosa M, Sharpe ME (1960) A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *J Appl Bact* 23:130-135.

- De Visscher A, Haesebrouck F, Piepers S, Vanderhaeghen W, Supré K, Leroy F, Van Coillie E, De Vliegher S (2013) Assessment of the suitability of mannitol salt agar for growing bovine-associated coagulase-negative staphylococci and its use under field conditions. *Res Vet Sci* 95:347-351.
- Debord B, Lefebvre C, Guyot-Hermann AM, Hubert J, Bouche R, Guyot JC (1987) Study of different crystalline forms of mannitol: comparative behavior under compression. *Drug Dev Ind Pharm* 13:1533-1546.
- Dianawati D, Mishra V, Shah NP (2012) Role of calcium alginate and mannitol in protecting *Bifidobacterium*. *Appl Environ Microbiol* 78:6914-6921.
- Dierick JF, Dieu M, Remacle J, Raes M, Roepstorff P, Toussaint O (2002) Proteomics in experimental gerontology. *Exp Gerontol* 37:721-734.
- Dulermo T, Rasclé C, Chinnici G, Gout E, Bligny R, Cotton P (2009) Dynamic carbon transfer during pathogenesis of sunflower by the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*: from plant hexoses to mannitol. *New Phytol* 183:1149-1162.
- Dumbrepatil A, Adsul M, Chaudhari S, Khire J, Gokhale D (2008) Utilization of molasses sugar for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* mutant Uc-3 in batch fermentation. *Appl Environ Microbiol* 74:333-335.
- Efiuvwevwere BJO, Gorris LGM, Smid EJ, Kets EPW (1999) Mannitol-enhanced survival of *Lactococcus lactis* subjected to drying. *Appl Microbiol Biotechnol* 51:100-104.
- Embuscado ME, Patil SK (2001) Erythritol. In *Food Science and Technology, Alternative sweeteners*, Dekker M (Ed.) 3rd Ed., Vol 17. New York, USA, pp. 235-254.
- Endo A, Futagawa-Endo Y, Dicks LMT (2009) Isolation and characterization of fructophilic lactic acid bacteria from fructose-rich niches. *Syst Appl Microbiol* 32:593-600.
- Erzinger GS, Vitolo M (2006) *Zymomonas mobilis* as catalyst for the biotechnological production of sorbitol and gluconic acid. *Appl Biochem Biotechnol* 131:787-794.
- Falentin H, Henaff N, Le Bivic P, Deutsch SM, Parayre S, Richoux R, Sohier D, Thierry A, Lortal S, Postollec F (2012) Reverse transcription quantitative PCR revealed persistency of thermophilic lactic acid bacteria metabolic activity until the end of the ripening of Emmental cheese. *Food Microbiol* 29:132-140.
- Falentin H, Postollec F, Parayre S, Henaff N, Le Bivic P, Richoux R, Thierry A, Sohier D, (2010) Specific metabolic activity of ripening bacteria quantified by real-time

- reverse transcription PCR throughout Emmental cheese manufacture. *Int J Food Microbiol* 144:10-19.
- Farooq U, Anjum FM, Zahoor T, Rahman SU, Randhawa MA, Ahmed A, Akram K (2012) Optimization of lactic acid production from cheap raw material: sugarcane molasses. *Pak J Bot* 44:333-338.
- Flórez J, Armijo JA (1992) Fármacos diuréticos. In *Farmacología Humana*, Florez J, Armijo JA and Mediavilla A (Eds.) Ediciones Científicas y Técnicas S.A. Barcelona, España, pp. 815-830.
- Fontes Coelho L, de Lima CJ, Bernardo MP, Contiero J (2011) D(-)-lactic acid production by *Leuconostoc mesenteroides* B512 using different carbon and nitrogen sources. *Appl Biochem Biotechnol* 164:1160-1171.
- Fontes CPML, Honorato TL, Rabelo MC, Rodrigues S (2009) Kinetic study of mannitol production using cashew apple juice as substrate. *Bioprocess Biosyst Eng* 32:493-499.
- Galano E, Mangiapane E, Bianga J, Palmese A, Pessione E, Szpunar J, Lobinski R, Amoresano A (2013) Privileged incorporation of selenium as selenocysteine in *Lactobacillus reuteri* proteins demonstrated by selenium-specific imaging and proteomics. *Mol Cell Proteomics* 12:2196-2204.
- Ganesan B, Weimer BC, Pinzon J, Dao Kong N, Rompato G, Brothersen C, McMahon DJ (2014) Probiotic bacteria survive in Cheddar cheese and modify populations of other lactic acid bacteria. *J Appl Microbiol* 116:1642-1656.
- Gao X, Qiao SY, Lu WQ (2009) Determination of an economical medium for growth of *Lactobacillus fermentum* using response surface methodology. *Lett Appl Microbiol* 49:556-561
- García Garibay M, Quintero Ramirez R, López-Mujía Canales A (2004) *Biología Alimentaria*. Editorial Limusa S.A., DF, México.
- Gaspar P, Carvalho AL, Vinga S, Santos H, Neves AR (2013) From physiology to systems metabolic engineering for the production of biochemicals by lactic acid bacteria. *Biotech Adv* 31:764-788.
- Ghosh S, Sudha ML (2012) A review on polyols: new frontiers for health-based bakery products. *Int J Food Sci Nutr* 63:372-379.

- Graves PR, Haystead TAJ (2002) Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiol Molecular Biol Rev* 66:39-63.
- Gutierrez AJE, Gaudillere JP (1996) Distribution, metabolism and role of sorbitol in higher plants. A review. *Agronomie* 5:281-298.
- Hahn G, Kaup B, Bringer-Meyer S, Sahm H (2003) A zinc-containing mannitol-2-dehydrogenase from *Leuconostoc pseudomesenteroides* ATCC 12291: purification of the enzyme and cloning of the gene. *Arch Microbiol* 179:101-107.
- Hammes WP, Vogel RF (1995) The genus *Lactobacillus*. In *The Genera of Lactic Acid Bacteria. Series The Lactic Acid Bacteria*, BJB Wood and WH Holzapfel (Eds.) Vol 2. Chapman y Hall, London, UK, pp. 19-54.
- Han B, Yu Z, Liu B, Ma Q, Zhang R (2011) Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* YJG, isolated from the mucosa of the gut of healthy chickens. *Afr J Microbiol Res* 5:1147-1155.
- Hase U, Reulen HI (1980) Influence of sorbitol and mannitol on intracranial pressure. *Neurochirurgia* 23:205-211.
- Hébert EM, Raya RR, Savoy de Giori G (2004) Evaluation of minimal nutritional requirements of lactic acid bacteria used in functional foods. In *Methods and Protocols. Series Methods in Biotechnology*, Spencer JFT and Ragout de Spencer AL (Eds.) Vol 16. Humana Press, Totowa, New Jersey, USA, pp. 139-148.
- Hendriksen HV, Mathiasen TE, Adler-Nissen J, Frisvald JC, Emborg C (1988) Production of mannitol by *Penicillium* strains. *J Chem Tech Biotechnol* 43:223-228.
- Hess JR, Greenwalt TG (2002) Storage of red blood cells: new approaches. *Transfus Med Rev* 16:283-295.
- Hughenoltz J (2008) The lactic acid bacterium as a cell factory for food ingredient production. *Int Dairy J* 18:466-475.
- Hustede H, Haberstroh HJ, Schinzig E (1989) Gluconic acid. In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 5th Ed., Vol A12. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, pp. 449-456.
- Ibarburu I, Aznar R, Elizaquível P, García-Quintáns N, López P, Munduate A, Irastorza A, Dueñas MT (2010) A real-time PCR assay for detection and quantification of 2-branched (1,3)- β -D-glucan producing lactic acid bacteria in cider. *Int J Food Microbiol* 143:26-31.

- Johanningsmeier SD, Franco W, Pérez-Díaz IM, McFeeters RF (2012) Influence of sodium chloride, pH, and lactic acid bacteria on anaerobic lactic acid utilization during fermented cucumber spoilage. *J Food Sci* 77:397-404.
- Johnson JC (1976) Specialized sugars for the Food Industry. *Food Technology Review*, Noyes Data Corp., Park Ridge, New Jersey, USA, pp. 313-323.
- Kampf G, Lecke C, Cimbak AK, Weist K, Rüdén H (1998) Evaluation of mannitol salt agar for detection of oxacillin resistance in *Staphylococcus aureus* by disk diffusion and agar screening. *J Clin Microbiol* 36:2254-2257.
- Karsten U, Barrow KD, Nixdorf O, West JA, King RJ (1997) Characterization of mannitol metabolism in the mangrove red alga *Caloglossa leprieurii*. *Planta* 201:173-178.
- Kashket ER (1987) Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS Microbiol Lett* 46:233-244.
- Kets EPW, Galinski EA, de Wit M, de Bont JAM, Heipieper HJ (1996) Mannitol, a novel bacterial compatible solute in *Pseudomonas putida* S12. *J Bacteriol* 178:6665-6670.
- Kitahara K (1938) Studies on the lactic acid bacteria isolated from milk & dairy products. *J Agric Chem Soc Jpn* 14:1449-1465 (Patente en Japonés).
- Klose J (1975) Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. *Humangenetik* 26:231-243.
- Korakli M, Vogel RF (2003) Purification and characterization of mannitol dehydrogenase from *Lactobacillus sanfranciscensis*. *FEMS Microbiol Lett* 220:281-286.
- Kroger M, Meister K, Kava R (2006) Low-calorie sweeteners and other sugar substitutes: A review of the safety issues. *Compr Rev Food Sci F* 5:35-47.
- Kulbe KD, Schwab U, Gudernatsch W (1987) Enzyme-catalyzed production of mannitol and gluconic acid. Product recovery by various procedures. *Ann NY Acad Sci* 506:552-568.
- Ladero V, Ramos A, Wiersma A, Goffin P, Schanck A, Kleerebezem M, Hugenholtz J, Smid EJ, Hols P (2007) High-level production of the low-calorie sugar sorbitol by *Lactobacillus plantarum* through metabolic engineering. *Appl Environ Microbiol* 73:1864-1872.
- Laitila A, Saarela M, Kirk L, Siika-aho M, Haikara A, Mattila-Sandholm T, Virkajärvi I (2004) Malt sprout extract medium for cultivation of *Lactobacillus plantarum* protective cultures. *Lett Appl Microbiol* 39:336-340.

- Lally RT, Ederer MN, Woolfrey BF (1985) Evaluation of mannitol salt agar with oxacillin as a screening medium for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 22:501-504.
- Lamberti C, Mangiapane E, Pessione A, Mazzoli R, Giunta C, Pessione E (2011) Proteomic characterization of a selenium-metabolizing probiotic *Lactobacillus reuteri* Lb2 BM for nutraceutical applications. Proteomics 11:2212-2221.
- Lawson ME (1997) Sugar alcohols. In *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, Kroschwitz JI and Howe-Grant M (Eds.) 4th Ed., Vol 23. John Wiley & Sons Inc., New York, USA, pp. 93-119.
- Lee JK, Oh DK, Song HY, Kim IW (2007) Ca²⁺ and Cu²⁺ supplementation increases mannitol production by *Candida magnoliae*. Biotechnol Lett 29:291-294.
- Lee JK, Song JY, Kim SY (2003) Controlling substrate concentration in fed-batch *Candida magnoliae* culture increases mannitol production. Biotechnol Prog 19:768-775.
- Lee K, Lee HG, Choi YJ (2008a) Proteomic analysis of the effect of bile salts on the intestinal and probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri*. J Biotechnol 137:14-19.
- Lee K, Lee HG, Pi K, Choi YJ (2008b) The effect of low pH on protein expression by the probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri*. Proteomics 8:1624-1630.
- Leroy F, De Vuyst L (2004) Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. Trends Food Sci Technol 15:67-78.
- Lindgren SE, Axelsson LT, McFeeters RF (1990) Anaerobic L-lactate degradation by *Lactobacillus plantarum*. FEMS Microbiol Lett 66:209-214.
- Liong MT, Shah NP (2005) Production of organic acids from fermentation of mannitol, fructooligosaccharide and inulin by a cholesterol removing *Lactobacillus acidophilus* strain. J Appl Microbiol 99:783-793.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta C_T$} Methods 25:402-408
- Livesey G (2003) Health potential of polyols as sugar replacers, with emphasis on low glycaemic properties. Nutr Res Rev 16:163-191.
- Lorimer DW, Hakanson NE, Pion PD, Merideth RE (1989) The effect of intravenous mannitol or oral glycerol on intraocular pressure in dogs. Cornell Vet 79:249-258.

- Lorquet F, Goffin P, Muscariello L, Baudry JB, Ladero V, Sacco M, Kleerebezem M, Hols P (2004) Characterization and functional analysis of the *poxB* gene, which encodes pyruvate oxidase in *Lactobacillus plantarum*. *J Bacteriol* 186:3749-3759.
- Martinez G, Barker HA, Horecker BL (1963) A specific mannitol dehydrogenase from *Lactobacillus brevis*. *J Biol Chem* 238:1598-1603.
- Mattarelli P, Holzapfel W, Franz CMAP, Endo A, Felis GE, Hammes W, Pot B, Dicks L, Dellaglio F (2014) Recommended minimal standards for description of new taxa of the genera *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* and related genera. *Int J Syst Evol Microbiol* 64:1434-1451.
- Mayo B, Aleksandrak-Piekarczyk T, Fernández M, Kowalczyk M, Álvarez-Martín P, Bardowski J (2010) Updates in the metabolism of lactic acid bacteria. In *Biotechnology of lactic acid bacteria. Novel applications*, Mozzi F, Raya RR, Vignolo G (Eds.) Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, USA, pp. 273-287.
- Mazzoli R, Bosco F, Mizrahi I, Bayer EA, Pessione E (2014) Towards lactic acid bacteria-based biorefineries. *Biotechnol Adv* 32:1216-1236.
- McDonald LC, Fleming HP, Hassan HM (1990) Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. *Appl Environ Microbiol* 56:2120-2124.
- McNaught AD (1996) Nomenclature of carbohydrates. *Pure Appl Chem* 68:1919-2008.
- McNutt K (2000) What clients need to know about sugar replacers. *J Am Diet Assoc* 100:466-469.
- Miller DM, Dudley EG, Robert RF (2012) Technical note: Development of a quantitative PCR method for monitoring strain dynamics during yogurt manufacture. *J Dairy Sci* 95:4868-4872.
- Monedero V, Pérez-Martínez G, Yebra MJ (2010) Perspectives of engineering lactic acid bacteria for biotechnological polyol production. *Appl Microbiol Biotechnol* 86:1003-1015.
- Morello E, Bermudez-Humaran LG, Llull D, Sole V, Miraglio N, Langella P, Poquet I (2008) *Lactococcus lactis*, an efficient cell factory for recombinant protein production and secretion. *J Mol Microbiol Biotechnol* 14:48-58.
- Murphy MG, O'Connor L, Walsh D, Condon S (1985) Oxygen dependent lactate utilization by *Lactobacillus plantarum*. *Arch Microbiol* 141:75-79.

- Nannen NL, Hutkins RW (1991) Intracellular pH effects in lactic acid bacteria. *J Dairy Sci* 74:741-746.
- Nidetzky B, Haltrich D, Schmidt K, Schmidt H, Weber A, Kulbe KD (1996) Simultaneous enzymic synthesis of mannitol and gluconic acid: II. Development of a continuous process for a coupled NAD(H)-dependent enzyme system. *Biocatal Biotransform* 14:47-65.
- Niehaus WG Jr, Dilts RP Jr (1982) Purification and characterization of mannitol dehydrogenase from *Aspergillus parasiticus*. *J Bacteriol* 151:243-250.
- Nyyssölä A, Pihlajaniemi A, Palva A, von Weymarn N, Leisola M (2005) Production of xylitol from D-xylose by recombinant *Lactococcus lactis*. *J Biotechnol* 118:55-66.
- O'Farrell PH (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 250:4007-4021.
- Onishi H, Suzuki T (1968) Production of D-mannitol and glycerol by yeasts. *Appl Microbiol* 16:1847-1852.
- Onishi H, Suzuki T (1970) Microbial production of D-mannitol and D-fructose from glycerol. *Biotechnol Bioeng* 12:913-920.
- Onishi H, Suzuki T (1971) Mannitol by yeast fermentation. U.S. patent US 3622456, 23.11.1971.
- Ortiz ME, Bleckwedel J, Raya RR, Mozzi F (2013) Biotechnological and *in situ* food production of polyols by lactic acid bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:4713-4726.
- Ortiz ME, Fornaguera MJ, Raya RR, Mozzi F (2012) *Lactobacillus reuteri* CRL 1101 highly produces mannitol from sugarcane molasses as carbon source. *Appl Microbiol Biotechnol* 95:991-999.
- Oude Elferink SJWH, Krooneman J, Gottschal JC, Spoelstra SF, Faber F, Driehuis F (2001) Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1,2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*. *Appl Environ Microbiol* 67:125-132.
- Papagianni M, Legisa M (2014) Increased mannitol production in *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 production strain with a modified 6-phosphofructo-1-kinase. *J Biotechnol* 181:20-26.

- Parajó JC, Dominguez H, Dominguez JM (1998) Biotechnological production of xylitol. Part 1: interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis. *Bioresour Technol* 65:191-201.
- Parmentier S, Arnaut F, Soetaert W, Vandamme EJ (2005) Enzymatic production of D-mannitol with *Leuconostoc pseudomesenteroides* mannitol dehydrogenase coupled to a coenzyme regeneration system. *Biocatal Biotransfor* 23:1-7.
- Pathak M, Martirosyan D (2012) Optimization of an effective growth medium for culturing probiotic bacteria for applications in strict vegetarian food products. *Journal of FFHD* 2:369-378.
- Patra F, Tomar SK, Arora S (2009) Technological and functional applications of low-calorie sweeteners from lactic acid bacteria. *J Food Sci* 74:16-23.
- Patra F, Tomar SK, Rajput YS, Singh R (2011) Characterization of mannitol producing strains of *Leuconostoc* species. *World J Microbiol Biotechnol* 27:933-939.
- Pessione E (2012) Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: lights and shadows. *Front Cell Infect Microbiol* 2:86.
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:2003-2007.
- Pfyffer GE, Rast DM (1980) The polyol pattern of some fungi not hitherto investigated for sugar alcohols. *Exp Mycol* 4:160-170.
- Plouvier V (1963) The distribution of aliphatic polyols and cyclitols. In *Chemical Plant Taxonomy*, T. Swain (Ed.) Academic Press, New York, USA, pp. 313-336.
- Pontes DS, de Azevedo MS, Chatel JM, Langella P, Azevedo V, Miyoshi A (2011) *Lactococcus lactis* as a live vector: heterologous protein production and DNA delivery systems. *Protein Expr Purif* 79:165-75.
- Proust JL (1802) Sur le sucre de miel. *J Phys* 54:199-200.
- Quatravaux S, Remize F, Bryckaert E, Colavizza D, Guzzo J (2006) Examination of *Lactobacillus plantarum* lactate metabolism side effects in relation to the modulation of aeration parameters. *J Appl Microbiol* 101:903-912.
- Rhee DJ, Ramos-Esteban JC, Nipper KS (2006) Rapid resolution of topiramate-induced angle-closure glaucoma with methylprednisolone and mannitol. *Am J Ophthalmol* 141:1133-1134.

- Richter H, Vlad D, Uden G (2001) Significance of pantothenate for glucose fermentation by *Oenococcus oeni* and for suppression of the erythritol and acetate production. *Arch Microbiol* 175:26-31.
- Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT (1997) Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 245:154-160.
- Rodríguez C, Rimaux T, Fornaguera MJ, Vrancken G, Font de Valdez G, De Vuyst L, Mozzi F (2012) Mannitol production by heterofermentative *Lactobacillus reuteri* CRL 1101 and *Lactobacillus fermentum* CRL 573 in free and controlled pH batch fermentations. *Appl Microbiol Biotechnol* 93:2519-2527.
- Russell JB (1991) Resistance of *Streptococcus bovis* to acetic acid at low pH: relationship between intracellular pH and anion accumulation. *Appl Environ Microbiol* 57:255-259.
- Saha BC (2004) Purification and characterization of a novel mannitol dehydrogenase from *Lactobacillus intermedius*. *Biotechnol Prog* 20:537-542.
- Saha BC (2006a) Effect of salt nutrients on mannitol production by *Lactobacillus intermedius* NRRL B-3693. *J Ind Microbiol Biotechnol* 33:887-890.
- Saha BC (2006b) A low-cost medium for mannitol production by *Lactobacillus intermedius* NRRL B-3693. *Appl Microbiol Biotechnol* 72:676-680.
- Saha BC (2006c) Production of mannitol from inulin by simultaneous enzymatic saccharification and fermentation with *Lactobacillus intermedius* NRRL B-3693. *Enzyme Microb Tech* 39:991-995.
- Saha BC, Nakamura LK (2003) Production of mannitol and lactic acid by fermentation with *Lactobacillus intermedius* NRRL B-3693. *Biotech Bioeng* 82:864-871.
- Saha BC, Racine FM (2010) Effects of pH and corn steep liquor variability on mannitol production by *Lactobacillus intermedius* NRRL B-3693. *Appl Microbiol Biotechnol* 87:553-560.
- Saha BC, Racine FM (2011) Biotechnological production of mannitol and its applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 89:879-891.
- Sakai S, Yamanaka K (1968) Crystalline D-mannitol:NAD oxidoreductase from *Leuconostoc mesenteroides*. *Biochim Biophys Acta* 151:684-686.

- Salminen S, Roberfroid M, Ramos P, Fonden R (1998) Prebiotic substrates and lactic acid bacteria. In *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*, Salminen S and von Wright A (Eds.) 2nd Ed. Marcel Dekker Inc., New York, USA, pp. 343-358.
- Salminen S, Hallikainen A (2002) Sweeteners. In *Food Additives*, Branen AL, Davidson, PM, Salminen S and Thorngate JH (Eds.) Marcel Dekker Ink., New York, USA, pp. 451-456.
- Salvetti E, Fondi M, Fani R, Torriani S, Felis GE (2013) Evolution of lactic acid bacteria in the order Lactobacillales as depicted by analysis of glycolysis and pentose phosphate pathways. *Syst Appl Microbiol* 36:291-305.
- Sambrook J, Russell DW (2001) Agarose gel electrophoresis. In *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- Sand M, Mingote AI, Santos H, Müller V, Averhoff B (2013) Mannitol, a compatible solute synthesized by *Acinetobacter baylyi* in a two-step mechanism including a salt-induced and salt-dependent mannitol-1-phosphate dehydrogenase. *Environ Microbiol* 15:2187-2197.
- Saraniya A, Jeevaratnam K (2014) Optimization of nutritional and non-nutritional factors involved for production of antimicrobial compounds from *Lactobacillus pentosus* SJ65 using response surface methodology. *Braz J Microbiol* 45:81-88.
- Sasaki Y, Laivenieks M, Zeikus JG (2005) *Lactobacillus reuteri* ATCC 53608 *mdh* gene cloning and recombinant mannitol dehydrogenase characterization. *Appl Microbiol Biotechnol* 68:36-41.
- Saulnier DM, Santos F, Roos S, Mistretta TA, Spinler JK, Molenaar D, Teusink B, Versalovic J (2011) Exploring metabolic pathway reconstruction and genome-wide expression profiling in *Lactobacillus reuteri* to define functional probiotic features. *PLoS ONE* 6:e18783.
- Schiweck H, Bär A, Vogel R, Schwarz E, Kunz M, Dusautois C, Clement A, Lefranc C, Lüssem B, Moser M, Peters S (2012) Sugar alcohols. In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 7th Ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, pp. 1-37.
- Schmittgen TD, Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method. *Nat Protoc* 3:1101-1108.

- Schneider KH, Giffhorn F (1989) Purification and properties of a polyol dehydrogenase from the phototrophic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. Eur J Biochem 184:15-19.
- Shen B, Hohmann S, Jensen RG, Bohnert HJ (1999) Roles of sugar alcohols in osmotic stress adaptation. Replacement of glycerol by mannitol and sorbitol in yeast. Plant Physiol 121:45-52.
- Shen B, Jensen RG, Bohnert HJ (1997) Mannitol protects against oxidation by hydroxyl radicals. Plant Physiol 115:527-532.
- Siegumfeldt H, Bjorn Rechinger K, Jakobsen M (2000) Dynamic changes of intracellular pH in individual lactic acid bacterium cells in response to a rapid drop in extracellular pH. Appl Environ Microbiol 66:2330-2335.
- Silveira MM, Wisbeck E, Lemmel C, Erzinger G, da Costa JP, Bertasso M, Jonas R (1999) Bioconversion of glucose and fructose to sorbitol and gluconic acid by untreated cells of *Zymomonas mobilis*. J Biotechnol 75:99-103.
- Slatner M, Nagl G, Haltrich D, Kulbe KD, Nidetzky B (1998) Enzymatic production of pure D-mannitol at high productivity. Biocatal Biotransform 16:351-363.
- Smiley KL, Cadmus MC, Liepins P (1967) Biosynthesis of D-mannitol from D-glucose by *Aspergillus candidus*. Biotechnol Bioeng 9:365-374.
- Smiley KL, Cadmus MC, Rogovin SP (1969) Shortened fermentation process for D-mannitol, U.S. patent US 3427224.
- Smirnoff N, Cumbes QJ (1989) Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. Phytochemistry 28:1057-1060.
- Söderling E, Hirvonen A, Karjalainen S, Fontana M, Catt D, Seppä L (2011) The effect of xylitol on the composition of the oral flora: a pilot study. Eur J Dent 5:24-31.
- Soetaert W, Buchholz K, Vandamme EJ (1995) Production of D-mannitol and D-lactic acid by fermentation with *Leuconostoc mesenteroides*. Agro Food Ind Hi Tec 6:41-44.
- Soetaert W, Vanhooren PT, Vandamme EJ (1999) The production of mannitol by fermentation. In *Carbohydrate Biotechnology Protocols, Series: Methods in Biotechnology™*, Bucke C (Ed.) Vol 10. Totowa, New Jersey, USA, pp. 261-275.
- Song KH, Lee JK, Song JY, Hong SG, Baek H, Kim SY, Hyun HH (2002) Production of mannitol by a novel strain of *Candida magnoliae*. Biotechnol Lett 24:9-12.

- Song SH, Vieille C (2009) Recent advances in the biological production of mannitol. *Appl Microbiol Biotechnol* 84:55-62.
- Sparrow RL (2012) Time to revisit red blood cell additive solutions and storage conditions: a role for "omics" analyses. *Blood Transfus* 10:s7-s11.
- Stanton C, Ross RP, Fitzgerald GF, Van Sinderen D (2005) Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. *Curr Opin Biotechnol* 16:198-203.
- Steidler L, Rottiers P (2006) Therapeutic drug delivery by genetically modified *Lactococcus lactis*. *Ann N Y Acad Sci* 1072:176-186.
- Stevens MJA, Vollenweider S, Meile L, Lacroix C (2011) 1,3-Propanediol dehydrogenases in *Lactobacillus reuteri*: impact on central metabolism and 3-hydroxypropionaldehyde production. *Microb Cell Fact* 10:61.
- Stolz P, Biicker G, Hammes WP, Vogel RF (1995) Utilization of electron acceptors by lactobacilli isolated from sourdough. *Z Lebensm Unters Forsch* 201:91-96.
- Stoop JMH, Mooibroek H (1998) Cloning and characterization of NADP-mannitol dehydrogenase cDNA from the button mushroom, *Agaricus bisporus*, and its expression in response to NaCl stress. *Appl Environ Microbiol* 64:4689-4696.
- Strandberg GW (1969) D-mannitol metabolism by *Aspergillus candidus*. *J Bacteriol* 97:1305-1309.
- Suzuki T, Higgins PJ, Crawford DR (2000) Control selection for RNA quantitation. *Biotechniques* 29:332-337.
- Tani Y, Vongsuvanlert V (1987) Sorbitol production by a methanol yeast *Candida boidinii* (*Kloeckera sp.*) No. 2201. *J Ferment Technol* 65:405-411.
- Tanzer JM (1995) Xylitol chewing gum and dental caries. *Int Dent J* 45:65-76.
- Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G, Grisar T, Igout A, Heinen E (1999) Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol* 75:291-295.
- van Munster IP, Nagengast FM (1993) The role of carbohydrate fermentation in colon cancer prevention. *Scand J Gastroenterol Suppl* 200:80-86.
- Vandamme EJ, van Loo J, Simkens E, De Laporte A (1987) Optimization of sucrose phosphorylase production by *Leuconostoc mesenteroides*. *J Chem Technol Biotechnol* 39:251-262.

- Veiga-da-Cunha M, Foster MA (1992) Sugar-glycerol cofermentations in lactobacilli: the fate of lactate. *J Appl Bacteriol* 174:1013-1019.
- Veiga-da-Cunha M, Santos H, van Schaftingen E (1993) Pathway and regulation of erythritol formation in *Leuconostoc oenos*. *J Bacteriol* 175:3941-3948.
- Viikari L, Korhola M (1986) Fructose metabolism in *Zymomonas mobilis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 24:471-476.
- Voegele RT, Hahn M, Lohaus G, Link T, Heiser I, Mendgen K (2005) Possible roles for mannitol and mannitol dehydrogenase in the biotrophic plant pathogen *Uromyces fabae*. *Plant Physiol* 137:190-198.
- von Weymarn N (2002) Process development for mannitol production by lactic acid bacteria. PhD Thesis. Helsinki University of Technology, Department of Chemical Technology. Helsinki, Finland.
- von Weymarn N, Hujanen M, Leisola M (2002) Production of D-mannitol by heterofermentative lactic acid bacteria. *Process Biochem* 37:1207-1213.
- von Wright A, Axelsson L (2012) Lactic Acid Bacteria: An Introduction. In *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*, Lahtinen S, Ouwehand AC, Salminen S and von Wright A (Eds.) 4th Ed. CRC Press, Taylor & Francis Group, New York, USA, pp. 1-16.
- Vrancken G, Rimaux T, De Vuyst L, Leroy F (2008) Kinetic analysis of growth and sugar consumption by *Lactobacillus fermentum* IMDO 130101 reveals adaptation to the acidic sourdough ecosystem. *Int J Food Microbiol* 128:58-66.
- Vrancken G, Rimaux T, De Vuyst L, Mozzi F (2010) Low-Calorie Sugars Produced by Lactic Acid Bacteria. In *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications*, Mozzi F, Raya RR and Vignolo GM (Eds.) Wiley-Blackwell, Oxford, UK, pp 193-209.
- Watkins RF, Gray MW (2008) Sampling gene diversity across the supergroup Amoebozoa: large EST data sets from *Acanthamoeba castellanii*, *Hartmannella vermiformis*, *Physarum polycephalum*, *Hyperamoeba dachnaya* and *Hyperamoeba sp.* *Protist* 159:269-281.
- Wennerholm K, Emilson CG, Birkhed D (1991) Sweeteners and dental health. In *Handbook of sweeteners*, Marie S and Piggott JR (Eds.), Springer Verlag US, New York, USA, pp. 205-224.

- Wichmann R, Wandrey C, Buckmann AF, Kula MR (1981) Continuous enzymatic transformation in an enzyme membrane reactor with simultaneous NAD(H) regeneration. *Biotechnol Bioeng* 23:2789-2802.
- Wisniak J, Simon R (1979) Hydrogenation of glucose, fructose, and their mixtures. *Ind Eng Chem Prod Res Dev* 18:50-57.
- Wisselink HW, Weusthuis RA, Eggink G, Hugenholtz J, Grobben GJ (2002) Mannitol production by lactic acid bacteria: a review. *Int Dairy J* 12:151-161.
- Wohlfarth C (2006) *CRC Handbook of Enthalpy Data of Polymer-Solvent Systems*. CRC Press, Tylor and Francis Group, Florida, USA.
- Wyatt TT, van Leeuwen MR, Wösten HAB, Dijksterhuis J (2014) Mannitol is essential for the development of stress-resistant ascospores in *Neosartorya fischeri* (*Aspergillus fischeri*) *Fungal Genet Biol* 64:11-24.
- Yancey PH, Clark ME, Hand SC, Bowlus RD, Somero GN (1982) Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* 217:1214-1222.
- Yue M, Cao H, Zhang J, Li S, Meng Y, Chen W, Huang L, Du Y (2013) Improvement of mannitol production by *Lactobacillus brevis* mutant 3-A5 based on dual-stage pH control and fed-batch fermentations. *World J Microbiol Biotechnol* 29:1923-1930.
- Yun JW, Kim DH (1998) A comparative study of mannitol production by two lactic acid bacteria. *J Ferment Bioeng* 85:203-208.
- Zaunmüller T, Eichert M, Richter H, Uden G (2006) Variations in the energy metabolism of biotechnologically relevant heterofermentative lactic acid bacteria during growth on sugars and organic acids. *Appl Microbiol Biotechnol* 72:421-429.



Producción de Manitol por Bacterias Lácticas

Tesis Doctoral

Lic. Maria Eugenia Ortiz

Año 2014



CERELA



CONICET