



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

---

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS CÓRDOBA

MAESTRIA EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN AGROALIMENTARIA

SUSTENTABLE

PRODUCCIÓN DE EXOPOLISACARIDOS (EPS) DE *Leuconostoc* spp. DE TIBICOS  
DE CAÑA DE AZÚCAR EN CULTIVO LÍQUIDO

JESÚS DAVID CASTILLA MARROQUÍN

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**AMATLÁN DE LOS REYES, VERACRUZ, MÉXICO**

2019

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALÍAS  
COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

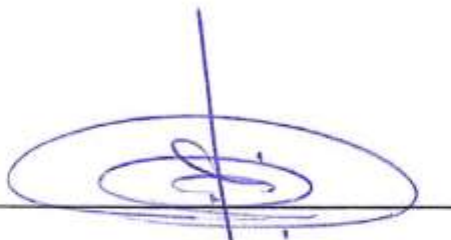
En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el (la) que suscribe José David Castilla Marroquín, Alumno(a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del profesor(a) Dr. Francis Hernández Rojas, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis Producción de Exopolisacáridos (EPS) de *Leuconostoc spp.* de Tubicos de Caña de Azúcar en Cultivo Líquido

Y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, el Profesor Consejero(a) o Director(a) de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Amatlán de los Reyes, Veracruz a 25 de Septiembre de 2019



Firma



Vo.Bo. del Profesor Consejero o Director de Tesis

La presente tesis, titulada: **Producción de Exopolisacáridos (EPS) de *Leuconostoc* spp de Tibicos de Caña de Azúcar en Cultivo Líquido**, realizada por el alumno: **Jesús David Castilla Marroquín**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**MAESTRIA EN INNOVACIÓN AGROALIMENTARIA SUSTENTABLE**

**CONSEJO PARTICULAR**

CONSEJERO:



Dr. Francisco Hernández Rosas

ASESOR:




Dra. María Antonieta Ríos Corripio

ASESOR:



Dr. Héctor Debernardi de la Vequia

ASESOR:



Dr. Juan Hernández Rosas

Amatlán de los Reyes, Veracruz, México, **septiembre 2019**

# PRODUCCIÓN DE EXOPOLISACARIDOS (EPS) DE *Leuconostoc* Sp DE TIBICOS DE CAÑA DE AZÚCAR EN CULTIVO LÍQUIDO

JESÚS DAVID CASTILLA MARROQUÍN

Colegio de Postgraduados, 2019

## RESUMEN

En México, la extracción de azúcar de caña de azúcar es la principal industria agroalimentaria; es relevante para impulsar la economía de las regiones productoras de caña de azúcar. Sin embargo, la competitividad internacional ha impactado negativamente, un hecho que ha generado la necesidad de diversificación, es decir, apuntar los esfuerzos para aprovechar coproductos y subproductos. En el presente trabajo se pretende estudiar la capacidad de *Leuconostoc* para producir exopolisacáridos (EPS), para lo cual se aislaron tres microorganismos identificados como (A, B y C) a partir de tibicos de caña de azúcar; la morfología de los aislamientos B y C correspondió a la bacteria ácido-láctica *Leuconostoc*. Por lo tanto, se determinó el potencial de estos aislamientos para producir EPS, específicamente dextrano en un sistema de cultivo líquido. Las condiciones de cultivo para la producción de EPS fueron  $1 \times 10^6$  (UFC) / ml a  $37^\circ \text{C}$  en agitación a 150 rpm por 24 horas. El EPS obtenido fue recuperado por precipitación con etanol frío y fue purificado con acetona fría. Los resultados mostraron que los aislamientos B y C tuvieron la capacidad de producir EPS (14 g / L para el aislamiento B y 32 g / L para el aislamiento C) después de 24 h. La caracterización por espectroscopía infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR) indicó que el EPS producido por las cepas aisladas era dextrano. Además, el dextrano producido presentó solubilidad en agua, resistencia a la congelación del agua a  $-4^\circ \text{C}$  y punto de ebullición a  $85^\circ \text{C}$ .

Palabras clave: Exopolisacáridos, sacarosa, cultivo en medio líquido, dextrano, biopolímeros, bacterias ácido-lácticas.

# EXOPOLYSACCHARIDE PRODUCTION BY *Leuconostoc* spp FROM SUGARCANE KEFIR IN LIQUID CULTURE

JESÚS DAVID CASTILLA MARROQUÍN

Colegio de Postgraduados, 2019

## ABSTRACT

In Mexico, sugar extraction from sugarcane is the main agri-food industry; it is relevant for boosting the economy of sugarcane-producing regions. However, international competitiveness has negatively impacted this industry, a fact that has generated the need for diversification, namely efforts to use co-products and by-products. In this work we aim to study extracellular polymeric substances (EPSs) production capacity by *Leuconostoc*, to achieve that, three microorganism isolates (A, B and C) were obtained from sugarcane kefir; the morphology of isolates B and C corresponded to the lactic acid bacterial genus *Leuconostoc*. Thus, we examined the potential for these isolates to produce EPSs, specifically dextran in a submerged culture system. The culture was performed by adjusting the active culture concentration to  $1 \times 10^6$  colony-forming units (CFU)/ml; the culture was maintained at 37°C and agitated at 150 rpm for 24 hours. The obtained EPSs was precipitated using cold ethanol and purified with cold acetone. The results showed that isolates B and C had the capacity to produce dextran (14 g/L for isolate B and 32 g/L for isolate C) after 24 h. Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR) characterization confirmed that the EPS was dextran. Further, the produced biopolymer had high solubility in water, avoided freezing at -4°C and boiled at 85°C.

*Keywords:* Exopolysaccharides, Sucrose, Dextransucrase, Dextran, Biopolymers.

## AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por el apoyo económico brindado durante mis estudios de postgrado.

Al **Colegio de Postgraduados Campus Córdoba**, al **Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada (CIBA-Tlaxcala, IPN)** y al **Dr. Marlon Rojas López** por haberme permitido el uso de equipos y reactivos en los diferentes análisis y experimentos dentro de mi investigación.

A mi **Consejo Particular**, gracias por aceptar ser parte de este equipo y por los consejos que cada uno me dio a lo largo del camino, al **Dr. Juan Hernández Rosas** gracias por compartir sus conocimientos conmigo, **Dra. Ma. Antonieta Ríos Corripio** gracias por el apoyo en la vinculación con el **CIBA** y su invaluable ayuda en la interpretación de los análisis FT-IR, **Dr. Héctor Debernardi de la Vequia** por sus ideas e impulso para conseguir los objetivos establecidos.

**Dr. Francisco Hernández Rosas** muchas gracias por el apoyo previo al inicio de mis estudios de postgrado y definitivamente durante el periodo de maestría, espero haber estado a la altura de sus expectativas.

**Dr. Ricardo Hernández Martínez** le agradezco profundamente por haberme integrado en su dinámica de trabajo, por soportar las veces que llegue a su oficina y me recibió sin dudar, por los consejos y conocimientos que me transmitió y por la labor en la revisión del artículo que se deriva de este trabajo de investigación.

A mis amigos y compañeros del colegio, **Pedro, José, Rosario, Erika, Mitzi, Nadia y Rubén**, entre consejos, regaños y buenos momentos, considero que son parte importante de esta etapa académica.

## DEDICATORIA

A **Lizeth**, mi compañera por 14 años, hemos vivido tanto, desde lo más hermoso hasta lo más difícil, eres el amor de mi vida, le agradezco profundamente al destino por haberme guiado a ti, te agradezco por toda la entrega que has tenido hacia mí, por soportar las veces que llegue a casa solo para seguir ocupado en cosas del colegio, todo esto inicio gracias a ti, fue tu idea estudiar los tibicos. Si no hubieras llegado a mi vida no estaría en alcanzando en este momento este logro, quizá no te lo he dicho lo suficiente, eres la persona más importante para mi y de no ser por tus palabras de apoyo en mis momentos más difíciles no hubiera podido salir adelante. Sabes bien que no veo mi vida si no estas a mi lado, quiero seguir caminando a tu lado, quiero que sepas que no me veo ni me he visto nunca superior a ti, somos un equipo y me siento muy orgulloso de ti porque también has logrado grandes cosas por tu cuenta.

A mis hijas **Fernanda** y **Ony**, mis esfuerzos están enfocados en poder proveer mejores oportunidades para ustedes, su compañía y ocurrencias me han ayudado a superar las dificultades que se han presentado, definitivamente lo mejor que me pudo pasar en la vida es ser su papá.

A mis padres **Armando** y **Lucia**, mis hermanos **Carlos**, **Carmen** y **Cecilia**, parte de lo que soy es gracias a ustedes, este logro en parte también es suyo.

## CONTENIDO

1. Introducción .....	1
1.1. Industria azucarera en México .....	1
1.2. Biopolímeros .....	4
1.3. Exopolisacáridos .....	5
1.4. Homopolisacáridos.....	8
1.5. Heteropolisacáridos .....	8
1.6. Dextrano .....	8
1.7. Polimerización del dextrano .....	9
1.8. Microorganismos productores de dextrano.....	9
1.9. Aplicaciones del dextrano .....	10
2. Justificación .....	13
3. Hipótesis.....	14
4. Objetivos.....	14
4.1. General .....	14
4.2. Específicos.....	14
5. Materiales y Métodos .....	15
5.1. Microorganismos .....	15
5.2. Purificación de las cepas .....	16
5.3. Caracterización de las cepas .....	16
5.3.1. Preservación de la cepa.....	16
5.4. Producción de dextrano en cultivo líquido .....	18



5.4.1. Determinación de azúcar .....	18
5.4.2. Purificación y caracterización del dextrano .....	18
5.4.3. Análisis por espectroscopia FT-IR.....	19
6. Resultados Y Discusión.....	20
6.1. Asilamiento y purificación del microorganismo .....	20
6.2. Preservación y viabilidad de los asilamientos .....	21
6.3. Producción de EPS en cultivo liquido .....	23
6.4. Análisis por espectroscopia FT-IR.....	25
7. Conclusión .....	28
8. Bibliografía .....	29

### LISTA DE FIGURAS

Figura 1.- Clasificación de los biopolímeros .....	5
Figura 2.- Reacción enzimática de la dextransacarasa con la sacarosa para la producción de dextrano.....	9
Figura 3.- Tibicos colectados en el Ingenio San José de Abajo.....	15
Figura 4.- Biomasa recuperada por centrifugación .....	17
Figura 5.- Biomasa al finalizar ciclo de lavados con agua esteril.....	17
Figura 6.- Colonias mucosas en agar MSE .....	201
Figura 7.- Tinción Gram de los aislamientos B y C .....	21
Figura 8. Preservados de los microorganismos con esferas plásticas en agua.	22
Figura 9.- Preservados reactivados en agar MRS.....	23
Figura 10.- Posibles rutas de carbono de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> .....	25
Figura 11. Espectro infrarrojo del dextrano comercial usado como estándar....	26

Figura 12. Espectro infrarrojo de los exopolisacáridos producidos por los aislamientos B y C..... 27

### **LISTA DE CUADROS**

Cuadro 1.- Derivados de la agroindustria azucarera y su producción comercial 2  
Cuadro 2.- Exopolisacáridos y microorganismos que los producen..... 6  
Cuadro 3.- Importancia comercial del dextrano ..... 10  
Cuadro 4.- Resultados de pruebas bioquímicas; +: reacción positiva, -: reacción negativa ..... 21  
Cuadro 5.- Evaluación de viabilidad de los aislamientos..... 23

## **1. INTRODUCCIÓN**

Las industrias agrícolas que generan productos básicos son muy importantes para la economía. Sin embargo, en los últimos años, la competitividad internacional y la disminución de los precios del mercado han estimulado la exploración de oportunidades en la cadena de valor para aumentar la rentabilidad y la sostenibilidad. En este escenario, la industria africana de la caña de azúcar ha estado explorando la producción de biopolímeros como un objetivo alternativo para la diversificación de productos para aumentar la competitividad y la rentabilidad (Higgins *et al.*, 2007; Thomson, *et al.*, 2017).

### **1.1. Industria azucarera en México**

La agroindustria de la caña de azúcar presenta una gran oportunidad para el desarrollo económico e industrial en muchos países productores de caña de azúcar. Sin embargo, este desarrollo solo puede lograrse si hay un enfoque multidisciplinario, que incluye objetivos económicos, ambientales, agronómicos, de ingeniería, financieros y estratégicos que incluyen variables de manera integradora, cualitativa y cuantitativa (Pippo y Luengo, 2013; Aguilar-Rivera, 2017). Durante la zafra 2018/2019 en México, los ingenios azucareros del país recibieron 56,990,367 toneladas de caña de azúcar y produjeron 6,898,253 toneladas de azúcar; hubo un excedente de azúcar de 2,358,513 toneladas (CONADESUCA, 2018).

Las características de los residuos agroindustriales y la biomasa generada durante la producción de azúcar pueden transformarse en productos de valor agregado mediante la aplicación adecuada de estrategias químicas y biotecnológicas (Solomon, 2011; Iqbal, Kyazze y Keshavarz, 2013). Estos derivados de la agroindustria azucarera se dividen en dos categorías, los subproductos: residuos de cosecha, bagazo, medula y cachaza (lodo de filtros) y los coproductos: melazas y sacarosa los cuales son puntal para la diversificación (Tabla 1) por su uso como materia prima para las industrias de

alimentación, farmacéutica papelera y de productos químicos (Aguilar-Rivera, Debernadi-Vazquez, y Herrera-Paz, 2017)

Cuadro 1.- Derivados de la agroindustria azucarera y su producción comercial

Material	Derivados	Aprovechamiento Comercial
Coproductos	Melazas y Sacarosa	Etanol combustible y alcohochímica, alcoholes de diverso peso molecular, ron y aguardiente, acetona, butanol, levadura para el consumo humano y panadería, autolizados de levadura, torula, invertasa, melaza de alta proteína, alfa-amilasa, <i>Azotobacter</i> , <i>Rhizobium</i> , CO <sub>2</sub> , biopesticidas, L-lisina, levadura hidrolizada, giberelinas, goma xantana, concentrado de proteínas, glucomananos, betaglucanos, <i>Beauveria bassiana</i> , penicilinas, <i>Trichoderam</i> , <i>Azospirillum</i> , dextranasa, celulasa, inoculante láctico, citocina, fitohormonas, ferridextrano, glucosa, sorbitol. Ácidos (acético, jasmónico, cítrico, indolacético, glutámico, succínico, itacónico, adípico, aspártico, levulínico, láctico), sucroquímica,

		bioplásticos, 5-hidroximetil furfural, glutamato monosódico, entre otros.
Subproductos	Residuos de Cosecha, bagazo y médula, cachaza (lodo de filtros)	Energía y vapor, pulpa y papel, tableros de partículas, fibras y cemento cartón, furfural y derivados, alfacelulosa, bagazo hirolizado y pre-digerido, carboximetilcelulosa y derivados, productos moldeados, Syngas (CO + H <sub>2</sub> ), ligninas sulfonadas, fenoles, carbón activado, etanol de segunda generación, azúcares fermentables, xilosa, xilitol, hongos comestibles, alimento animal, compostas, materiales compuestos (composites), pellets, lignina, biogás, BioOil, compostas, alimento pecuario, ceras, fitoesteroles, entre otros.

En México, la industria azucarera tiene un gran potencial de producción debido a su aporte económico y nutricional, pero en los últimos años ha habido serios problemas operativos y de rentabilidad (Anaya-Reza y López-Arenas, 2017).

Por otro lado, el deterioro de la caña de azúcar después de la cosecha causa pérdida de sacarosa principalmente por hidrólisis de sacarosa por la invertasa endógena, así como la síntesis de dextrano (Cuervo *et al.*, 2010) por las especies *Streptococcus*,

*Lactobacillus* y *Leuconostoc* (Bhatia, Jyoti, Uppal, Thind, y Batta, 2009; Naessens, Cerdobbel, Soetaert, y Vandamme, 2005).

La pérdida de sacarosa impacta negativamente a la industria azucarera ya que actualmente, la diversificación productiva industrial se reduce a la obtención de azúcar morena (crudo), blanca (refinada) y en menor volumen mascabado, etanol, compostas y panela, situación que afecta la rentabilidad del cultivo de caña azúcar y la producción de esta (Aguilar-Rivera, 2017a).

La biotecnología aplicada a la agricultura ofrece una variedad de acercamientos científicos para la mejora de plantas, animales y microorganismos apuntado a desarrollar soluciones para la productividad y sustentabilidad agrícola, lo que a su vez genera herramientas que pueden ser aprovechadas por la industria para producir moléculas con un alto valor agregado (Lokko *et al.*, 2018).

## **1.2. Biopolímeros**

El término biopolímero usualmente se aplica a los polímeros producidos de manera natural por seres vivos, los biopolímeros son biomoléculas poliméricas unidas por enlace covalente para formar moléculas más grandes, su estructura molecular está compuesta por unidades repetidas de carbohidratos, ácidos nucleicos o aminoácidos y en algunos casos ramificaciones de compuestos químicos que contribuyen a sus funcionalidades. Los biopolímeros se clasifican de diferentes maneras según diferentes escalas. En función de su degradabilidad, los biopolímeros se pueden dividir en dos grandes grupos, biodegradables y no biodegradables, y alternativamente, en biopolímeros de base biológica y de base no biológica (Figura 1). Sobre la base de su estructura principal polimérica, los biopolímeros se pueden clasificar en los siguientes grupos: poliésteres, polisacáridos, policarbonatos, poliamidas y polímeros de vinilo. A su vez los biopolímeros se clasifican en tres grupos: los polisacáridos, hechos de azúcares (por ejemplo, celulosa que se encuentra en las plantas), las proteínas, hechas de

aminoácidos (por ejemplo, mioglobina encontrado en los tejidos musculares), y los ácidos nucleicos, formados por nucleótidos (ADN, material genético de un organismo dado). Según la aplicación, los biopolímeros se pueden clasificar como bioplásticos, biosurfactantes, biodetergentes, bioadhesivos, biofloculantes, etc (Chassenieux, *et al.*, 2013; Mohan *et al.*, 2016).



Figura 1.- Clasificación de los biopolímeros (Mohan *et al.*, 2016)

### 1.3. Exopolisacáridos

Los EPS son polímeros de alto peso molecular secretados por los microorganismos en el ambiente circundante, usualmente los EPS están formados por monosacáridos y constituyentes como piruvato, acetato, fosfato y succinato. Estos se dividen en homopolisacáridos y heteropolisacáridos. Los EPS son producidos por diversos bacterias, microalgas, hongos y levaduras (Tabla 2) (Freitas, Torres, y Reis, 2017; Hussain *et al.*, 2017)

Cuadro 2.- Exopolisacáridos y microorganismos que los producen

EPS	Microorganismo
Bacteria	
Alginato	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Azotobacter sp.</i>
Dextrano	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Lactobacillus hilgardii</i> , <i>Leuconostoc dextranicum</i> , <i>Streptococcus mutans</i>
Celulosa	<i>Acetobacter xylinum</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Agrobacterium Rhizobium sp.</i>
Curdlan	<i>Alcaligenes faecalis</i> , var. <i>Myxogenes</i>
Goma Xantana	<i>Xanthomonas Campestris</i>
Succinoglicano	<i>Alcaligenes faecalis</i> , var. <i>Myxogenes</i>
Glucuronatos	<i>Sinorhizobium meliloti</i> , <i>Gluconacetobactaria</i>
Ácido Colanico	<i>E. coli</i> , <i>Shigella spp.</i> , <i>Salmonella spp.</i> , <i>Enterobacter spp.</i>
Ácido Haluronico	<i>Streptococcus sp.</i>
Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Goma Welan	<i>Alcaligenes sp.</i>



Levano	<i>Alcaligenes viscosus, Zymomonas mobilis, Bacillus subtilis</i>
Kefirano	<i>Lactobacillus hilgardii, L. rhamnosus, L. kefir, L. kefiranofasciens</i>
Goma Gellan	<i>Aureomonas elodea, Sphingomonas paucimobilis, Sphingomonas elodea</i>
Hongos	
Pululano	<i>Antrodia cinnamomea, Aspergillus sp Y16, Aureobasidium pullulans</i>
Escleroglucano	<i>Fusarium solani, Ganoderma lucidum, Sclerotium sp.</i>
Sizofirano	<i>Schizophyllum commune</i>
Microalgas	
Frutarom (Alguard™)	<i>Porphidium sp.</i>
	<i>Anabaena augstmalis, Dunaliella tertiolecta, Gyrodinium impudicum, Porphidium autumnale, Rhodella sp, Synechocystis aqualitis</i>

## 1.4. Homopolisacáridos

Están compuestos por un monosacárido del tipo D-glucosa o L-Fructosa, se dividen en tres grupos distintivos. El primero consiste en  $\alpha$ -D-glucanos producidos por *Leuconostoc mesenteroides*. El segundo grupo consiste en  $\beta$ -D-glucanos sintetizados por las bacterias *Pediococcus* sp y *Streptococcus* sp. El tercer grupo consiste en fructanos producidos por *Streptococcus salivarius*. Entre los homopolisacáridos se encuentran: celulosa, dextrano y curdlan (Hussain *et al.*, 2017; More *et al.*, 2014).

### 1.4.1. Heteropolisacáridos

Los heteropolisacáridos son producidos por BAL por unidades repetidas de monosacáridos las cuales varían desde disacáridos hasta heptasacáridos, uno de los heteropolisacáridos más estudiados es el alginato producido por *Pseudomonas aeruginosa* y *Azotobacter*, otros ejemplos son la goma xantana, ácido halurónico y la heparina (Hussain *et al.*, 2017; More *et al.*, 2014)

## 1.5. Dextrano

El dextrano es un polímero de alto peso molecular formado por moléculas de glucosa enlazadas de cadena larga consecutivas, estas macromoléculas están compuestas principalmente por unidades D-glucosa con enlaces  $\alpha$ -(1,6), mientras que el grado de ramificación contiene enlaces  $\alpha$ -(1,3), raramente  $\alpha$ -(1,2) y  $\alpha$ -(1,4), se produce a partir de sacarosa por BAL del género *Leuconostoc*, *Lactobacillus* y *Streptococcus* (Casettari *et al.*, 2015; Karandikar, Mirani, Waybhase, Patravale, y Patankar, 2017; More *et al.*, 2014; Rani, Anandharaj, Sabhapathy, y Ravindran, 2017; van Heerden, Eggleston, y Donaldson, 2013)

## 1.6. Polimerización del dextrano

El proceso de polimerización es catalizado por la dextransacarasa, una enzima extracelular del grupo de las glucosiltransferasas y que es producida principalmente por microorganismos pertenecientes a las familias *Lactobacillaceae* y *Streptococcaceae*, específicamente por los géneros *Lactobacillus*, y *Streptococcus* (Miljkovic *et al.*, 2017). Esta enzima utiliza sacarosa como sustrato rompiendo el enlace entre la glucosa y la fructosa para generar dextrano y fructosa (Figura 2).

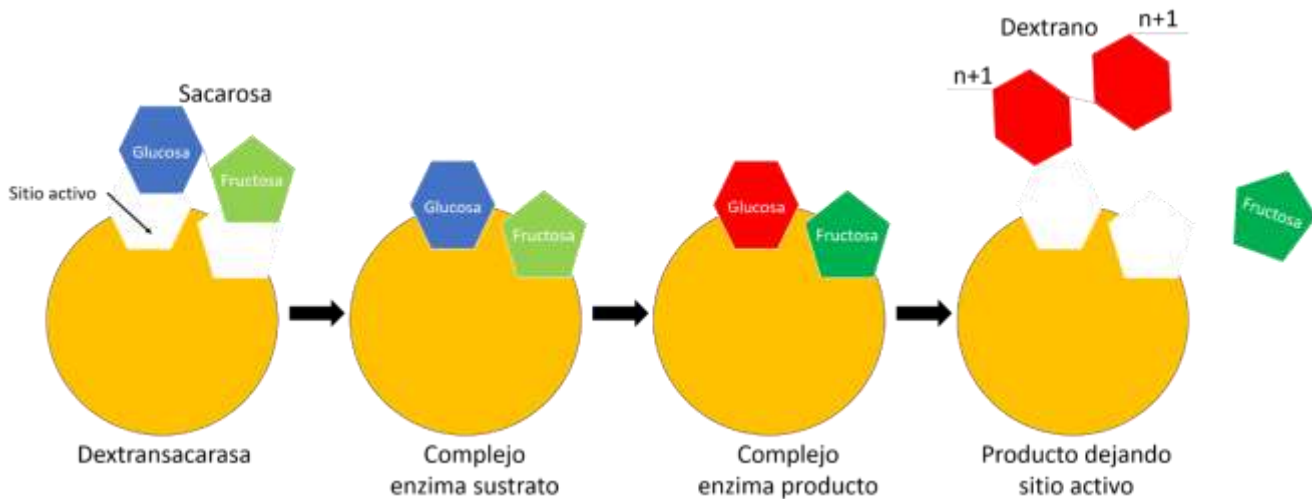


Figura 2.- Reacción enzimática de la dextransacarasa con la sacarosa para la producción de dextrano (Figura elaborada en Microsoft® PowerPoint 365)

## 1.7. Microorganismos productores de dextrano

Las principales BAL productoras de dextrano son *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Streptococcus*, de estas, las pertenecientes al género *Leuconostoc* producen dextrano con una gran variedad estructural y propiedades fisicoquímicas por lo que ha recibido más atención debido a la potencial producción a escala comercial (Naessens *et al.*, 2005). Entre las que se encuentran el dextrano producido por *L. mesenteroides* NRRL B-640 (Purama, Goswami, Khan, y Goyal, 2009) con cadena lineal compuesta

principalmente de enlaces  $\alpha$ -1,6 que le otorga comportamiento pseudoplástico no Newtoniano, un dextrano soluble en agua sintetizado por *L. citreum* SK24.002 (Miao *et al.*, 2014) compuesto principalmente de enlaces  $\alpha$ -1,3 (Yang *et al.*, 2015).

### 1.8. Aplicaciones del dextrano

El dextrano tiene una diversa área de aplicación en las industrias de los alimentos, cosmetología, médicas, tratamiento de aguas residuales y uso en laboratorios (Bhavani & Nisha, 2010; Yildiz & Karatas, 2018) como se muestra en la tabla 3

Cuadro 3.- Importancia comercial del dextrano	
Alimentos	
Productos de panadería	Mejora la suavidad, textura y volumen de esponjado
Repostería	Se usa como aditivo y estabilizador para prevenir la cristalización, mejorar la retención de humedad, aumentar la viscosidad y conservar el sabor
Helados	En concentraciones de 2 a 4% beneficia considerablemente la viscosidad, generando comportamiento

Comidas congeladas y deshidratadas	<p>Favorece la estabilización al vacío, deshidratado al aire, deshidratado en frío y alimentos congelados</p> <p>Es usado como conservador de textura, sabor y promotor de aroma en alimentos congelados</p>
Usos Médicos	
Efecto antitrombótico	<p>Disminuye la trombosis bascular mediante la unión de eritrocitos, plaquetas y el endotelio vascular incrementando su electronegatividad y por lo tanto reduciendo la acumulación de eritrocitos y la adhesividad plaquetaria</p>
Fluidos intravenosos	<p>Actúa como un fluido osmóticamente neutro el cual una vez ha entrado al cuerpo es digerido por las células en glucosa y agua libre</p>
Actividad anticoagulante	<p>Dextrano grado clínico disponible como Dextran 1, Dextran 40, Dextran 60 y Dextran 70 son usados comúnmente en situaciones de pérdida de sangre, sustitutos de plasma y profilaxis de trombosis</p>

Criopreservación	Se utiliza como soluciones para almacenar órganos para trasplante, así como transportadoras de vacunas
Cosméticos	
	<p>Es utilizado como agente antienvjecimiento, antiarrugas, antiinflamatorio y antialérgico</p> <p>Como tratamiento para la piel áspera y agrietada</p> <p>Aumenta la actividad de la lipasa produciendo efectos reductores de peso y piel flexible</p>
Uso en laboratorios	
	<p>Tiene aplicaciones como inmovilizador en biosensores</p> <p>En pellets se usa para ayudar en aplicaciones de biosensores</p> <p>, Como recubrimiento estabilizador para proteger nano partículas metálicas de la oxidación y mejorar la biocompatibilidad</p>

El dextrano obtenido de *Leuconostoc* spp. puede ser utilizado en la industria de biopelículas comestibles, Davidović *et al.*, (2018) hizo una película comestible con una mezcla de dextrano y sorbitol. O en el caso de Wang *et al* (2016) donde se utilizó un dextrano de alta densidad como vehículo para el transporte de nanopartículas de Fe (hierro) para la liberación controlada en el organismo sin generar reacciones secundarias como dolor de espalda, dolor torácico, disnea, aumento en la presión arterial, cefalea, presión arterial diastólica elevada, vómitos, malestar torácico o escalofríos.

## 2. JUSTIFICACIÓN

La mayoría de las BAL bajo condiciones adecuadas, es decir, en presencia de sustratos como sacarosa, son capaces de formar exopolisacáridos (EPS) en grandes cantidades, lo que permite su uso para la producción de estos polímeros (Paulo *et al.*, 2012). En el proceso del ingenio azucarero, un complejo bacteriano que contiene levadura, bacterias ácido acéticas y bacterias ácido lácticas (BAL), incluido *Leuconostoc* spp., es responsable de la formación de dextrano a partir del deterioro de la sacarosa (Davidović *et al.*, 2014; Fiorda *et al.*, 2017; Hemme y Foucaud-Scheunemann, 2004).

Se ha incrementado el interés en la producción de biocompuestos y biomoléculas debido a su potencial bioactivo y su extenso rango de aplicaciones en la industria, farmacología, agricultura y diversos campos más (Amjres *et al.*, 2015). Normalmente, el dextrano produce problemas masivos por el taponamiento de tuberías en el proceso de extracción de azúcar (Cuervo *et al.*, 2010). Sin embargo, puede haber una oportunidad biotecnológica que se implemente en la industria azucarera para desarrollar un proceso para la producción de dextrano, ya que tiene diversas aplicaciones en las industrias farmacéutica, alimentaria y textil (He *et al.*, 2014; Moosavi-Nasab, Gavahian, Yousefi, y Askari, 2010) Otra ventaja que permite su uso para ingesta o aplicación en humanos es que en 2013 la Food and Drug Administration (FDA) renovó el estatus del dextrano como

una sustancia Generally Regarded As Safe (GRAS ) (Kothari, Das, Patel, & Goyal, 2015)

Considerando este panorama en la industria azucarera se puede lograr la diversificación con el aprovechamiento y uso innovador de microorganismos nativos como *Leuconostoc* para la producción de biomoléculas con valor agregado y por el otro lado, cumplir en la generación y aplicación de biopelículas y biomoléculas la cual es una de las necesidades expuestas por el SNITT (2016).

### **3. HIPÓTESIS**

Las bacterias ácido-lácticas presentes en el complejo bacteriano de caña de azúcar son capaces de producir exopolisacáridos por cultivo en medio líquido con características fisicoquímicas de gran potencial agroalimentario.

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1. General**

Producir y caracterizar fisicoquímicamente los EPS del complejo bacteriano de caña de azúcar

#### **4.2. Específicos**

Caracterizar fisicoquímicamente los microorganismos presentes en el complejo bacteriano de caña de azúcar.

Extraer y purificar los EPS producidos por los microorganismos aislados.

Caracterizar los EPS puros



## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Microorganismos

Los microorganismos utilizados en el presente trabajo fueron aislados de muestras de tibicos (Figura 3) obtenidos del proceso de extracción de sacarosa del Ingenio San José de Abajo ubicado en Cuitláhuac, Veracruz. Las muestras fueron cultivadas usando panela como fuente de carbono, el cultivo fue mantenido por 24 horas a 25°C sin agitación. Se inocularon muestras de 10µL por 24 horas en agar Mayeux, Sandine Elliker (MSE) que contiene (g l<sup>-1</sup>): triptona (10) (BD BACTO®), extracto de levadura (5) (BD BIOXON®), sacarosa (100) (BD BIOXON®), citrato de sodio (1) (JT BAKER®), glucosa (5) (MAYER®) y azida de sodio (0.075) (QUANTYKA®) y agar (15) (BD Bioxon®) (Cuervo Muler *et al.*, 2010; Nieto-Arribas, Seseña, Poveda, Palop, y Cabezas, 2010)

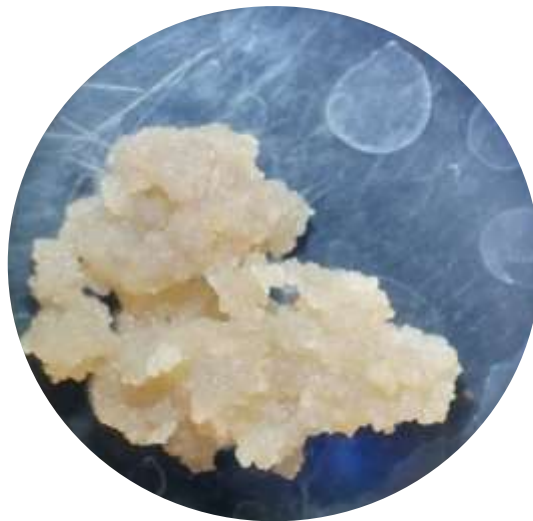


Figura 3.- Tibicos colectados en el Ingenio San José de Abajo

## **5.2. Purificación de las cepas**

Las cepas fueron inoculadas en placas de agar MSE por el método Digrafsky (Hedderich *et al.*, 2011) y se incubaron a 37°C por 24 h para obtener colonias purificadas.

## **5.3. Caracterización de las cepas**

Las cepas fueron caracterizadas con base en sus características morfológicas, bioquímicas y fisiológicas (Aman, Siddiqui, y Qader, 2012). La caracterización de las cepas se realizó mediante tinción de Gram y las pruebas de catalasa y oxidasa (Nair y Surendran, 2005). Para la prueba fisiológica, se evaluó la capacidad de las cepas para producir exopolisacáridos en medio MRS líquido (Leemhuis *et al.*, 2013).

### **5.3.1. Preservación de la cepa**

Para preservar las cepas, los aislamientos fueron inoculados en agar MRS e incubados a 37°C por 24h (Davidović *et al.*, 2014; Han *et al.*, 2014; Paulo *et al.*, 2012). La biomasa producida en agar MRS (BD BIOXON®) que contiene (g l<sup>-1</sup>): proteosa peptona No. 3 (10), extracto de carne (10), extracto de levadura (5), glucosa (20) polisorbato 80 (1), fosfato dipotásico (2), acetato de sodio (5), citrato de amonio (2) sulfato de magnesio (0.1), sulfato de manganeso (0.05), agar (15), fue cosechada e inoculada en matraces Erlenmeyer de 250 mL con caldo MRS para producción de biomasa, el cultivo se mantuvo a 37°C por 24 h a 150 rpm. Se recuperó la biomasa por centrifugación a 15000 rpm por 15 minutos (Figura 4), los pellets fueron suspendidos y lavados dos veces con agua estéril (Figura 5). Se sumergieron esferas de plástico en la biomasa resuspendida permitiendo a los microorganismos adherirse a la superficie esférica y fueron colocados en crioviales que contenían agua estéril y mantenidos a 4°C (Rojas-Tapias *et al.*, 2013; Holzapfel, Björkroth y Dicks, 2015). Las cepas preservadas fueron usadas para la producción de EPS; primero fueron reactivados en agar MRS por 24 h a 37°C, las cepas

reactivadas fueron inoculadas en matraces Erlenmeyer que contenían 50 mL de caldo MRS y mantenidas a 37°C por 24h a 150 rpm, la biomasa producida fue considerada como inóculo (Nieto-Arribas *et al.*, 2010).



Figura 4.- Biomasa recuperada por centrifugación



Figura 5.- Biomasa al finalizar ciclo de lavados con agua estéril

## **5.4. Producción de dextrano en cultivo líquido**

La producción de dextrano se realizó en un sistema de cultivo líquido usando matraces Erlenmeyer de 250 ml, con 200 mL de caldo MRS. La producción de dextrano se realizó a 150 rpm en un agitador IKA® orbital shaker KS260 por 24h a 37°C ajustando el inóculo a  $1 \times 10^6$  UFC/mL (Srinivas y Naga Padma, 2014)

### **5.4.1. Determinación de azúcares**

Los carbohidratos totales fueron determinados por el método fenol-sulfúrico (Dubois, Hamilton, Rebers, Smith, y Gilles, 1956), los azúcares reductores fueron analizados con el método ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959), como estándar en ambos análisis se utilizó glucosa (MEYER®). Los azúcares totales y azúcares reductores fueron analizados al inicio y final del cultivo líquido. Adicionalmente, el dextrano fue cuantificado (después de la purificación) por el método de Dubois (1956).

### **5.4.2. Purificación y caracterización del dextrano**

Se recupero el dextrano del medio de cultivo separando la biomasa y materia insoluble por centrifugación a 15000 rpm por 15 minutos a 4°C (SAVANT® SC210A) para obtener el sobrenadante limpio. Para la purificación el dextrano fue precipitado del sobrenadante usando etanol gélido (96) % a relación (2:1) (etanol: cultivo líquido). La mezcla se mantuvo a 4°C y el dextrano se recuperó por centrifugación a 15000 rpm a 4°C por 15 minutos. El dextrano precipitado fue disuelto en agua estéril (10 mL) dos veces para eliminar fracciones de fructosa o glucosa no polimerizada, el dextrano fue lavado tres veces con 30 mL de acetona fría y posteriormente precipitado con etanol frío y se mantuvo a 4°C. En cada punto la mezcla fue centrifugada a 15000 rpm por 15

minutos a 4 grados, finalmente fue secado a 40°C por 18 horas (Sarwat, Qader, Aman, y Ahmed, 2008; Vettori, Franchetti, y Contiero, 2012).

La solubilización del dextrano fue analizada agregando 1g de dextrano purificado en 100 mL de agua destilada, las mezclas fueron agitadas a 150 rpm en un agitador IKA® orbital shaker KS260 a 25°C. Se midió el tiempo requerido para que el dextrano se disolviera al punto en el que los sólidos en suspensión no eran visibles (Paulo *et al.*, 2012). Mientras que el punto de ebullición se realizó disolviendo 1 gr de dextrano puro el cual se calentó en una parrilla eléctrica, la temperatura se midió constantemente hasta llegar al punto de ebullición (Yang *et al.*, 2015)

#### **5.4.3. Análisis por espectroscopia FT-IR**

Se obtuvo el espectro FT-IR para el dextrano producido por *Leuconostoc* sp en cultivo líquido aislado de tibicos de caña de azúcar usando el espectrómetro Bruker® Infrared Spectrometer Vertex 70 con una resolución de 4 cm<sup>-1</sup>, en el modo de muestreo de Refracción Total Atenuada (ATR) por sus siglas en inglés. Un diamante de cristal con refracción única fue usado y el porcentaje de transmisión de este tipo de platos es mayor a 25. La región de medición fue en el infrarrojo medio, de 4000 a 400 cm<sup>-1</sup>, el equipo está equipado al software OPUS® para la adquisición de datos. Para analizar los espectros se usó el software Origin® 6.1 (OriginLab Corporation, USA) (Lenshin, Kashkarov, Seredin, Spivak, y Moshnikov, 2011). Se utilizó dextrano comercial de PM ~200,000 Da (SIGMA-ALDRICH®) producido por *Leuconostoc mesenteroides* como control.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Asilamiento y purificación del microorganismo

Se aislaron tres cepas de apariencia mucosa (Figura 6) que crecieron en agar MSE (Sarwat *et al.*, 2008), las cuales se identificaron como A, B y C. Los resultados de la tinción de Gram indicaron que tanto en las cajas B y C ( Figura 7) había presencia de colonias correspondientes a las características morfológicas de *Leuconostoc*, según lo descrito por Davidovic *et al* (2014) y Hemme y Foucaud-Scheunemann (2004) *Leuconostoc* es una bacteria Gram positivo con morfología de cocobacilos cortos agrupado en pares o cadenas cortas y negativa a la prueba de catalasa, siendo esto consistente con los resultados obtenidos en los aislamientos analizados como se muestra en la tabla 4. Se observo mayor capacidad de supervivencia para las cepas desarrolladas en agar MRS siendo semejante a otros trabajos donde se utilizó agar MRS como estándar para el desarrollo celular (Davidović *et al.*, 2014; Freitas *et al.*, 2017; Miao *et al.*, 2014; Naessens *et al.*, 2005; Paulo *et al.*, 2012; Purama *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2015).

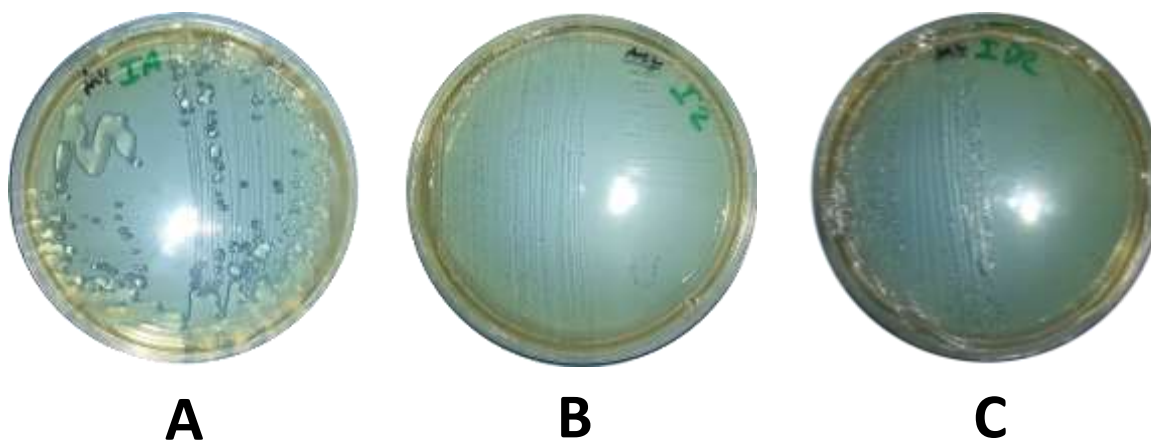


Figura 6.- Colonias mucosas de las cepas aisladas en agar MSE

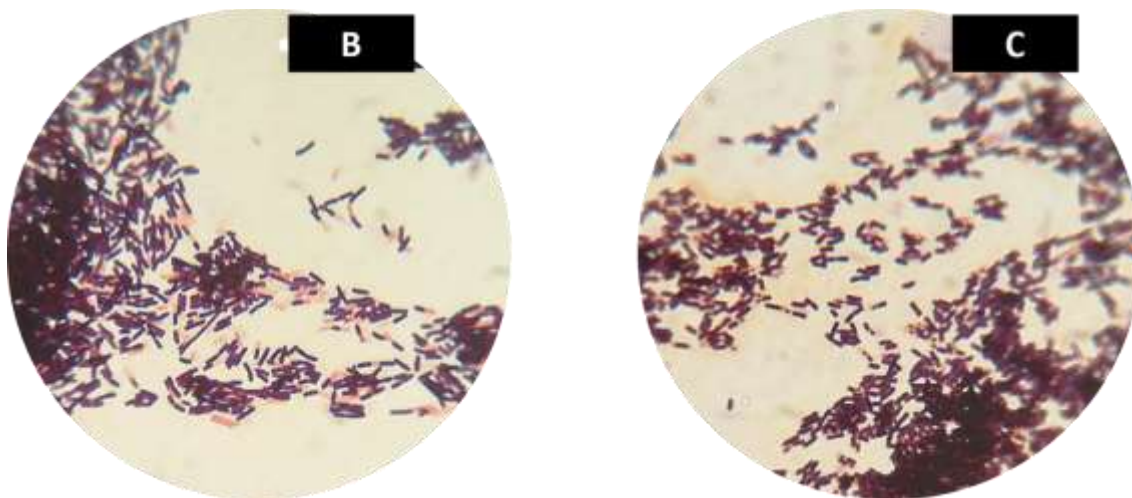


Figura 7.- Tinción Gram de los aislamientos B y C

Cuadro 4.- Resultados de pruebas bioquímicas; +: reacción positiva, -: reacción negativa

Características	Aislamiento		
	A	B	C
Tinción de Gram	+	+	+
Forma celular	Cocobacilos	Cocobacilos	Cocobacilos
Catalasa	-	-	-

### 6.2. Preservación y viabilidad de los asilamientos

Las cepas aisladas se conservaron en agua estéril utilizando esferas plásticas (Figura 8). Se probó la viabilidad de las cepas agregando una esfera plástica de cada cepa

preservada en agar MRS (Figura 9). Las cepas permanecieron activas durante un período de 9 meses y se siguió determinando la viabilidad (Tabla 5). Dichos resultados concuerdan con lo reportado por Holzapfel, Björkroth y Dicks (2015). Los resultados indicaron que esta técnica de preservación ha demostrado ser ideal para mantener estos microorganismos en stock durante largos períodos de tiempo con una alta actividad celular y sin cambios en la bioquímica y el comportamiento metabólico de las cepas aisladas. Este resultado es prometedor ya que se logró mantener la viabilidad de las cepas en condiciones controladas y de esta manera tenerlas disponibles para futuras investigaciones. Este resultado es similar al reportado por Juven (1979) donde se usó piedra pómez como inerte.



Figura 8. Preservados de los microorganismos A, B y C con esferas plásticas en agua.





Figura 9.- Preservados de los microorganismos A, B y C reactivados en agar MRS

Cuadro 5.- Evaluación de viabilidad de los aislamientos

<b>Preservado</b>	<b>2</b>	<b>D2</b>
<b>Noviembre 2018</b>	Activo	Activo
<b>Diciembre 2018</b>	Activo	Activo
<b>Enero 2019</b>	Activo	Activo
<b>Febrero 2019</b>	Activo	Activo
<b>Marzo 2019</b>	Activo	Activo
<b>Abril 2019</b>	Activo	Activo
<b>Mayo 2019</b>	Activo	Activo
<b>Junio 2019</b>	Activo	Activo
<b>Julio 2019</b>	Activo	Activo
<b>Agosto 2019</b>	Activo	Activo

### **6.3. Producción de EPS en cultivo líquido**

Los resultados obtenidos del cultivo mostraron que el contenido de sacarosa para los aislamientos B y C disminuyó un 55% (p / v), es decir, 55 g/L, después de 24 h de cultivo. El consumo de sacarosa por *Leuconostoc* spp. puede tener diferentes destinos debido a su metabolismo heterofermentativo (Bailey y Oxford, 1958). La Figura 10 muestra las posibilidades de diferentes fuentes de carbono en diferentes condiciones, utilizando

sacarosa como única fuente de carbono *Leuconostoc* puede producir dextrano como resultado principal del producto del metabolismo y la segunda posibilidad es la fructosa.

En este trabajo, las cepas mostraron la capacidad de producir 14 y 32 g / L de dextrano respectivamente, utilizando sacarosa en cultivo sumergido; este resultado es superior a la concentración máxima de dextrano (18.46 g / L) reportada por Davidovic *et al.* (2014) y similar en el máximo de dextrano reportado (32.15 g / L) por Han *et al.*, (2014). La concentración de dextrano obtenida en cultivo sumergido por las cepas de *Leuconostoc* B y C en este trabajo, se obtuvo utilizando un sistema de producción sin optimización, por lo que el resultado refleja la alta capacidad de síntesis de dextrano de las cepas B y C aisladas de tónicos obtenidos del proceso de obtención de azúcar incluso en condiciones no ideales. Por otro lado, la concentración de azúcares totales en cultivo sumergido para cepas de *Leuconostoc* B y C aislamientos se monitorearon, los resultados indicaron una disminución de 33.5 a 18% (p / v), este fenómeno posiblemente se deba a la glucosa liberada por las hidrólisis de sacarosa que se puede usar como fuente de carbono para el microorganismo para la síntesis de dextrano por la presencia de dextransacarasa (Han *et al.*, 2014). Los posibles destinos de la fructosa (no cuantificada) liberada por la hidrólisis de sacarosa, podrían convertirse en otros metabolitos como el manitol deshidrogenasa. Las fracciones de glucosa no polimerizadas se pueden usar como sustrato para la producción de ácido láctico mediante fosfoquetolasa, tanto el manitol como el ácido láctico son los principales subproductos obtenidos, el CO<sub>2</sub> y el ácido acético también pueden obtenerse. (van Heerden *et al.*, 2013).

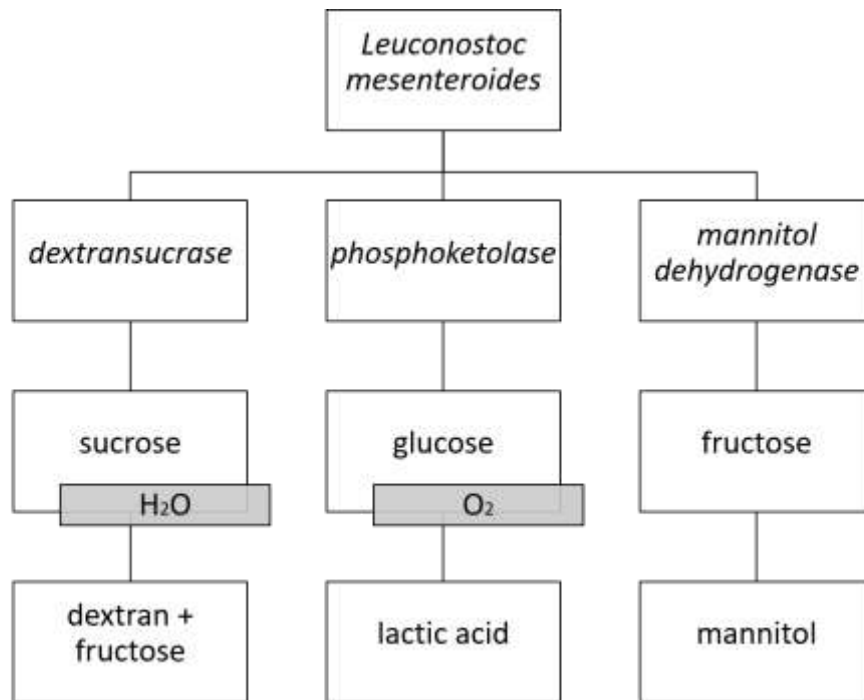


Figura 10.- Posibles rutas de carbono de *Leuconostoc mesenteroides* (van Heerden et al., 2013)

#### 6.4. Análisis por espectroscopia FT-IR

Se utilizaron muestras purificadas de EPS para el análisis FT-IR con el fin de corroborar que el EPS produce era un dextrano. La espectroscopia infrarroja se utilizó para identificar la estructura característica principal del dextrano. La Figura 11 muestra el espectro del dextrano en la región de 1400-600  $\text{cm}^{-1}$ . Las bandas del espectro representan todos los grupos funcionales presentes que constituyen este polisacárido, todos ellos contribuyen con sus grupos funcionales (-C-O-C, -C-O). Se detectaron los principales grupos estructurales del dextrano. Las principales bandas de absorción que caracterizan el exopolisacárido  $\alpha$  de dextrano (1  $\rightarrow$  6) se encontraron en la región de 1150  $\text{cm}^{-1}$ , en relación con las vibraciones del enlace de glucósidos COC, el pico ancho a 1105  $\text{cm}^{-1}$  era relevante para la vibración del enlace de CO en la posición C-4 de un

residuo de glucosa, la presencia de un pico de absorción a  $1010\text{ cm}^{-1}$  refleja la gran flexibilidad de la cadena de dextrano descrita a  $912\text{ cm}^{-1}$  e indica la existencia de este enlace glucósido en la conformación alfa ( $\alpha$ ) (Shingel, 2002). La Figura 12 muestra que el espectro infrarrojo en B era como el espectro C, la forma de la línea es muy similar a alrededor de  $1400\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ , solo se detectaron leves cambios de banda. El análisis por espectroscopía infrarroja confirmó los grupos funcionales de dextrano sintetizados por las cepas B y C; las bandas que se observan en ambos espectros son iguales al espectro de dextrano característico de un polisacárido. Los espectros FTIR del dextrano sintetizado por las cepas B y C fueron muy similares a lo obtenido por Paulo *et al.*, (2012), Davidovic *et al.*, (2014) y Han *et al.*, (2014) indican una estructura similar.

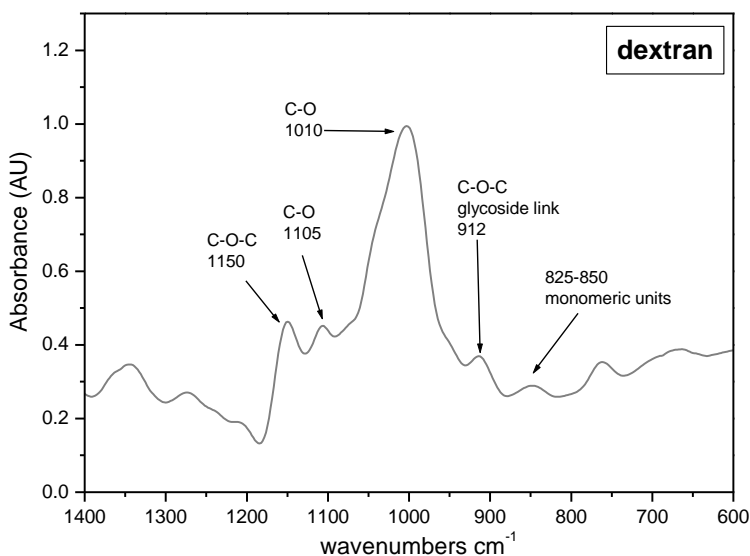


Figura 11. Espectro infrarrojo del dextrano comercial de  $\sim 200,000\text{ Da}$  (SIGMA-ALDRICH®) usado como estándar

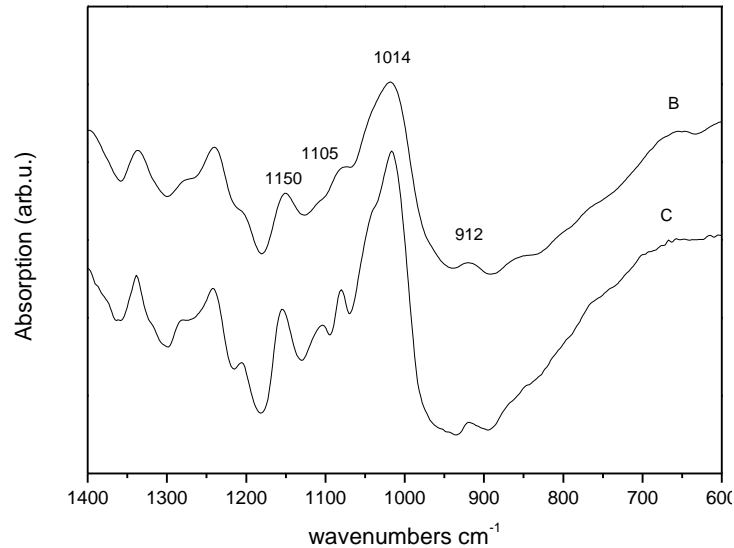


Figura 12. Espectro infrarrojo de los exopolisacáridos producidos por los aislamientos B y C

### 6.5. Propiedades del dextrano

Para la caracterización de dextrano, el dextrano obtenido de un cultivo sumergido se purificó como se indicó en la sección experimental. Después de la purificación, el dextrano producido a partir de los aislamientos de *Leuconostoc* B y C mostró capacidad para evitar la congelación, se ha reportado que el dextrano tiene la capacidad de prevenir la cristalización (Yildiz y Karatas, 2018). El dextrano puro calentado de ambos aislamientos mostró que en ambos casos el punto de ebullición se alcanzó a 85 ° C, esta temperatura se informa en las especificaciones técnicas del dextrano comercial (Guidechem, 2019). La solubilización del dextrano de los aislamientos B y C indicó la disolución total en agua destilada a 25 ° C después de 1 hora y 17 minutos, la solubilidad del dextrano está relacionada con el grado de ramificación (Paulo *et al.*, 2012). Los resultados indicaron que las características mostradas por el dextrano producido por los aislamientos B y C de *Leuconostoc* son interesantes para aplicaciones industriales.

## 7. CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos indicaron que las cepas aisladas están relacionadas bioquímica y morfológicamente con los géneros *Leuconostoc* y la estrategia de preservación de las cepas en agua destilada esterilizada permitió a los aislamientos B y C una mejor estabilidad celular y una mayor viabilidad para reactivarse a partir de la preservación para usarse en la fase experimental para producir el EPS.

Las cepas B y C aisladas de tibicos del proceso de extracción de azúcar mostraron la capacidad de producir dextrano. Esto abre una oportunidad para la diversificación agroindustrial de la caña de azúcar.

Finalmente, la espectroscopia infrarroja confirmó que el polisacárido obtenido era dextrano, esta técnica ofrece una alternativa rápida y no destructiva a las técnicas de medición química para la caracterización.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar-Rivera, N. (2017a). Cadena de valor de la diversificación de la agroindustria de la caña de azúcar en México. *Agroproductividad*, 10(11), 21–28.
- Aguilar-Rivera, N. (2017b). Estrategias metodológicas para el análisis de la reconversión y diversificación productiva de regiones cañeras. *Cuadernos Geográficos*, 56, 172–192.
- Aguilar-Rivera, N., Debernadi-Vazquez, T. J., & Herrera-Paz, H. . (2017). *Byproducts , Coproducts and Derivatives of*. 10, 13–20.
- Aman, A., Siddiqui, N. N., & Qader, S. A. U. (2012). Characterization and potential applications of high molecular weight dextran produced by *Leuconostoc mesenteroides* AA1. *Carbohydrate Polymers*.  
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.08.094>
- Amjres, H., Béjar, V., Quesada, E., Carranza, D., Abrini, J., Siquin, C., ... Llamas, I. (2015). Characterization of haloglycan, an exopolysaccharide produced by *Halomonas stenophila* HK30. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 117–124. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.07.052>
- Anaya-Reza, O., & López-Arenas, T. (2017). Design of a Sustainable Biorefinery for the Production of Lactic. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*.
- Bailey, R. W., & Oxford, A. E. (1958). A quantitative study of the production of dextran from sucrose by rumen strains of *Streptococcus bovis*. *Journal of General Microbiology*. <https://doi.org/10.1099/00221287-19-1-130>
- Bhatia, S., Jyoti, Uppal, S. K., Thind, K. S., & Batta, S. K. (2009). Post harvest quality deterioration in sugarcane under different environmental conditions. *Sugar Tech*.

<https://doi.org/10.1007/s12355-009-0023-7>

Bhavani, A. L., & Nisha, J. (2010). Dextran - The polysaccharide with versatile uses. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*.

Casettari, L., Bonacucina, G., Morris, G. A., Perinelli, D. R., Lucaioli, P., Cespi, M., & Palmieri, G. F. (2015). Dextran and its potential use as tablet excipient. *Powder Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2014.12.030>

Chassenieux, C., Durand, D., Jyotishkumar, P., & Thomas, S. (2013). Biopolymers: State of the Art, New Challenges, and Opportunities. In *Handbook of Biopolymer-Based Materials: From Blends and Composites to Gels and Complex Networks*. <https://doi.org/10.1002/9783527652457.ch1>

CONADESUCA. (2018). *Balance Nacional de azúcar ciclo 2018/2019*.

Cuervo Muler, R., Ledesma, J., & Durán Vanegas, J. (2010). Aislamiento y control microbiológico de leuconostoc mesenteroides, en un ingenio para optimizar el rendimiento de azúcar y etanol. *Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial: BSAA*.

Davidović, S., Miljkovic, M., Antonovic, D., Rajilic-Stojanovic, M., & Dimitrijevic-Brankovic, S. (2014). Water Kefir grain as a source of potent dextran producing lactic acid bacteria. *Hemijaska Industrija Chemical Industry*. <https://doi.org/10.2298/hemind140925083d>

Davidović, S., Miljković, M., Tomić, M., Gordić, M., Nešić, A., & Dimitrijević, S. (2018). Response surface methodology for optimisation of edible coatings based on dextran from *Leuconostoc mesenteroides* T3. *Carbohydrate Polymers*. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.12.061>



- Dubois, M., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Smith, F., & Gilles, K. A. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars. *ANALYTICAL CHEMISTRY*.
- Fiorda, F. A., de Melo Pereira, G. V., Thomaz-Soccol, V., Rakshit, S. K., Pagnoncelli, M. G. B., Vandenberghe, L. P. de S., & Soccol, C. R. (2017, September 1). Microbiological, biochemical, and functional aspects of sugary kefir fermentation - A review. *Food Microbiology*, Vol. 66, pp. 86–95.  
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.04.004>
- Freitas, F., Torres, C. A. V., & Reis, M. A. M. (2017). Engineering aspects of microbial exopolysaccharide production. *Bioresource Technology*.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.092>
- Guidechem. (2019). Dextran Material Safety Data Sheet(MSDS). Retrieved from  
<https://www.guidechem.com/msds/9004-54-0.html>
- Han, J., Hang, F., Guo, B., Liu, Z., You, C., & Wu, Z. (2014). Dextran synthesized by *Leuconostoc mesenteroides* BD1710 in tomato juice supplemented with sucrose. *Carbohydrate Polymers*. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.06.035>
- He, M. xiong, Qin, H., Yin, X. bo, Ruan, Z. yong, Tan, F. rong, Wu, B., ... Hu, Q. chun. (2014). Direct ethanol production from dextran industrial waste water by *Zymomonas mobilis*. *Korean Journal of Chemical Engineering*.  
<https://doi.org/10.1007/s11814-014-0108-1>
- Hedderich, R., Müller, R., Greulich, Y., Bannert, N., Holland, G., Kaiser, P., & Reissbrodt, R. (2011). Mechanical damage to Gram-negative bacteria by surface plating with the Drigalski-spatula technique. *International Journal of Food Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.005>
- Hemme, D., & Foucaud-Scheunemann, C. (2004). *Leuconostoc*, characteristics, use in

dairy technology and prospects in functional foods. *International Dairy Journal*.  
<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2003.10.005>

Higgins, A., Thorburn, P., Archer, A., & Jakku, E. (2007). Opportunities for value chain research in sugar industries. *Agricultural Systems*, 94(3), 611–621.  
<https://doi.org/10.1016/j.agry.2007.02.011>

Holzappel, W. H., Björkroth, J. A., & Dicks, L. M. T. (2015). *Leuconostoc*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*.  
<https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00607>

Hussain, A., Zia, K. M., Tabasum, S., Noreen, A., Ali, M., Iqbal, R., & Zuber, M. (2017). Blends and composites of exopolysaccharides; properties and applications: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.09.104>

Iqbal, H. M. N., Kyazze, G., & Keshavarz, T. (2013). Advances in the valorization of lignocellulosic materials by biotechnology: An overview. *BioResources*.  
<https://doi.org/10.15376/biores.8.2.3157-3176>

JUVEN, B. J. (1979). A Simple Method for Long-term Preservation of Stock Cultures of Lactic Acid Bacteria. *Journal of Applied Bacteriology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1979.tb01197.x>

Karandikar, S., Mirani, A., Waybhase, V., Patravale, V. B., & Patankar, S. (2017). Nanovaccines for oral delivery-formulation strategies and challenges. In *Nanostructures for Oral Medicine*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-47720-8.00011-0>

Kothari, D., Das, D., Patel, S., & Goyal, A. (2015). Dextran and food application. In *Polysaccharides: Bioactivity and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319->

Leemhuis, H., Pijning, T., Dobruchowska, J. M., van Leeuwen, S. S., Kralj, S., Dijkstra, B. W., & Dijkhuizen, L. (2013). Glucansucrases: Three-dimensional structures, reactions, mechanism,  $\alpha$ -glucan analysis and their implications in biotechnology and food applications. *Journal of Biotechnology*.  
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.06.037>

Lenshin, A. S., Kashkarov, V. M., Seredin, P. V., Spivak, Y. M., & Moshnikov, V. A. (2011). XANES and IR spectroscopy study of the electronic structure and chemical composition of porous silicon on n- and p-type substrates. *Semiconductors*.  
<https://doi.org/10.1134/s1063782611090168>

Lokko, Y., Heijde, M., Schebesta, K., Scholtès, P., Van Montagu, M., & Giacca, M. (2018). Biotechnology and the bioeconomy—Towards inclusive and sustainable industrial development. *New Biotechnology*.  
<https://doi.org/10.1016/j.nbt.2017.06.005>

Miao, M., Bai, A., Jiang, B., Song, Y., Cui, S. W., & Zhang, T. (2014). Food Hydrocolloids Characterisation of a novel water-soluble polysaccharide from *Leuconostoc citreum* SK24 . 002. *Food Hydrocolloids*, 36, 265–272.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.10.014>

Miljkovic, M., Davidović, S., Kralj, S., Siler-Marinkovic, S., Rajilic-Stojanovic, M., & Dimitrijevic-Brankovic, S. (2017). Characterization of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* T3, water kefir grains isolate. *Hemijska Industrija* *Chemical Industry*. <https://doi.org/10.2298/hemind160421046m>

Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>

- Mohan, S., Oluwafemi, O. S., Kalarikkal, N., Thomas, S., & Songca, S. P. (2016). Biopolymers – Application in Nanoscience and Nanotechnology. In *Recent Advances in Biopolymers*. <https://doi.org/10.5772/62225>
- Moosavi-Nasab, M. (Shiraz U., Gavahian, M., Yousefi, A. R., & Askari, H. (2010). Fermentative Production of Dextran using Food Industry Wastes. *World Academy of Science, Engineering and Technology*.
- More, T. . T., Yadav, J. S. S., Yan, S., Tyagi, R. D., & Surampalli, R. Y. (2014). Extracellular polymeric substances of bacteria and their potential environmental applications. *Journal of Environmental Management*, 144, 1–25. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.05.010>
- Naessens, M., Cerdobbel, A., Soetaert, W., & Vandamme, E. J. (2005). Leuconostoc dextranase and dextran: Production, properties and applications. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1002/jctb.1322>
- Nair, P. S., & Surendran, P. K. (2005). Biochemical Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated From Fish and Prawn. *Journal of Culture Collections*, 4, 48–52.
- Nieto-Arribas, P., Seseña, S., Poveda, J. M., Palop, L., & Cabezas, L. (2010). Genotypic and technological characterization of Leuconostoc isolates to be used as adjunct starters in Manchego cheese manufacture. *Food Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.08.006>
- Paulo, E. M., Boffo, E. F., Branco, A., Valente, Â. M. M. P., Melo, I. S., Ferreira, A. G., ... de Assis, S. A. (2012). Production, extraction and characterization of exopolysaccharides produced by the native Leuconostoc pseudomesenteroides R2 strain. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652012000200018>

- Pippo, W. A., & Luengo, C. A. (2013). Sugarcane energy use: accounting of feedstock energy considering current agro-industrial trends and their feasibility. *International Journal of Energy and Environmental Engineering*, 4(1), 10.  
<https://doi.org/10.1186/2251-6832-4-10>
- Purama, R. K., Goswami, P., Khan, A. T., & Goyal, A. (2009). Structural analysis and properties of dextran produced by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-640. *Carbohydrate Polymers*. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.09.018>
- Rani, R. P., Anandharaj, M., Sabhapathy, P., & Ravindran, A. D. (2017). Physicochemical and biological characterization of novel exopolysaccharide produced by *Bacillus tequilensis* FR9 isolated from chicken. *International Journal of Biological Macromolecules*. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.11.122>
- Rojas-Tapias, D., Ortiz-Vera, M., Rivera, D., Kloepper, J., & Bonilla, R. (2013). Evaluation of three methods for preservation of *Azotobacter chroococcum* and *Azotobacter vinelandii*. *Universitas Scientiarum*.  
<https://doi.org/10.11144/Javeriana.SC18-2.etmp>
- Sarwat, F., Qader, S. A. U., Aman, A., & Ahmed, N. (2008). Production & characterization of a unique dextran from an indigenous *Leuconostoc mesenteroides* CMG713. *International Journal of Biological Sciences*.  
<https://doi.org/10.7150/ijbs.4.379>
- Shingel, K. I. (2002). Determination of structural peculiarities of dextran, pullulan and  $\gamma$ -irradiated pullulan by Fourier-transform IR spectroscopy. *Carbohydrate Research*.  
[https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(02\)00209-4](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(02)00209-4)
- SNITT. (2016). *Agenda Nacional de Investigación, Innovación y Transferencia de Tecnología.pdf*. SAGARPA.

- Solomon, S. (2011). Sugarcane By-Products Based Industries in India. *Sugar Tech*.  
<https://doi.org/10.1007/s12355-011-0114-0>
- Srinivas, B., & Naga Padma, P. (2014). Screening of Diverse Micronutrients and Macronutrients For Dextran Production by *Weissella* sp Using Plackett-Burman Design. *International Journal of Scientific and Research Publications*.
- Thomson, W. A., Kohler, M., & Stark, A. (2017). An economic analysis of the potential bio-polymer industry: the case of sugarcane. *Proceedings of the Annual Congress - South African Sugar Technologists' Association*, (No.90), 411–414. Retrieved from <http://sasta.co.za/publications/congress-proceedings>
- van Heerden, P. D. R., Eggleston, G., & Donaldson, R. A. (2013). Ripening and Postharvest Deterioration. In *Sugarcane: Physiology, Biochemistry, and Functional Biology*. <https://doi.org/10.1002/9781118771280.ch4>
- Vettori, M. H. P. B., Franchetti, S. M. M., & Contiero, J. (2012). Structural characterization of a new dextran with a low degree of branching produced by *Leuconostoc mesenteroides* FT045B dextransucrase. *Carbohydrate Polymers*.  
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.02.048>
- Wang, G., Chen, F., Banda, N. K., Holers, V. M., Wu, L. P., Moghimi, S. M., & Simberg, D. (2016). Activation of human complement system by dextran-coated iron oxide nanoparticles is not affected by dextran/Fe ratio, hydroxyl modifications, and crosslinking. *Frontiers in Immunology*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00418>
- Yang, Y., Peng, Q., Guo, Y., Han, Y., Xiao, H., & Zhou, Z. (2015). Isolation and characterization of dextran produced by *Leuconostoc citreum* NM105 from manchurian sauerkraut. *Carbohydrate Polymers*, 133, 365–372.  
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.07.061>

Yildiz, H., & Karatas, N. (2018). Microbial exopolysaccharides: Resources and bioactive properties. *Process Biochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.06.009>