

23
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**CARACTERIZACION DE ENZIMAS EXTRACE-
LULARES DE MICROORGANISMOS AISLADOS
DE LA CAÑA DE AZUCAR**

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

MARTHA DOLORES BIBBINS MARTINEZ

MEXICO, D. F.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1990



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

| | Página |
|---|--------|
| INTRODUCCION | 1 |
| OBJETIVO | 3 |
| ANTECEDENTES | |
| I. Microbiología del azúcar de caña | 4 |
| II. Polisacáridos producidos por fermentación | 14 |
| A. La levana | 15 |
| A.1 Levansacarasa | 16 |
| A.2 Producción de levansacarasa | 16 |
| B. La dextrana | 17 |
| B.1 La dextransacarasa | 18 |
| C. El alternano | 20 |
| III. Condiciones de fermentación para la óptima producción enzimática. | 21 |
| MATERIAL Y METODOS | |
| I. Aislamiento e identificación | 25 |
| II. Producción de la enzima | 28 |
| III. Purificación de la enzima | 52 |
| IV. Condiciones de síntesis enzimática | 53 |
| V. Análisis de polímero y azúcares | 53 |
| VI. Procedencia de los reactivos | 54 |

RESULTADOS Y DISCUSION

PARTE I. PRODUCCION, PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE

LA FRUCTOSILTRANSFERASA PRODUCIDA POR B. circulans.

| | |
|--|----|
| I. Aislamiento e identificación | 35 |
| II. Producción de la enzima | 42 |
| 1. Caracterización de la cinética de fermentación | 42 |
| 2. Caracterización de la producción de la actividad enzimática durante la fermentación. | 44 |
| 3. Relación entre pH de crecimiento y producción de la enzima. | 48 |
| 4. Efecto de la fuente de carbono utilizada en el medio de fermentación en la producción de la enzima. | 50 |
| III. Purificación de la enzima | 51 |
| a. Por extracción con PEG | 52 |
| b. Por precipitación con sulfato de amonio | 54 |
| c. Por cromatografía por filtración en gel | 57 |
| IV. Caracterización enzimática | 62 |

PARTE II. PRODUCCION DE LA ALTERNANSACARASA DE

L. mesenteroides NRRL-B1355

| | |
|--|----|
| I. Condiciones de fermentación | 69 |
| II. Purificación de la enzima alternansacarasa | 71 |
| III. Caracterización de la alternansacarasa | 72 |

| | |
|--------------|----|
| CONCLUSIONES | 82 |
|--------------|----|

| | |
|-------------|----|
| REFERENCIAS | 84 |
|-------------|----|

INTRODUCCION

El proyecto de investigación que constituye este trabajo es resultado de la creciente importancia de la Biotecnología, en general, y en particular de la tecnología enzimática en las industrias, alimentaria, química y farmacéutica entre otras.

El aislamiento de microorganismos capaces de producir enzimas con potencial uso industrial que permitan, entre otras cosas, el desarrollo de nuevos productos y materias primas, la incorporación de alimentos no convencionales y el mejoramiento nutricional de los ya existentes, día a día adquiere mayor relevancia (López-Munguía, 1985).

Así tenemos que, la selección de microorganismos de diversas fuentes, con capacidad de producir enzimas que se adapten a necesidades específicas y que, mediante la aplicación de nuevas metodologías, se puedan inducir a la producción de una actividad específica, justifica el desarrollo de proyectos en la investigación de esta área. Este trabajo está en particular referido a la industria de la caña de azúcar.

El aumento en la viscosidad de soluciones de sacarosa debido al desarrollo de microorganismos capaces de sintetizar polímeros extracelulares, es un problema presente en la industria azucarera desde el siglo pasado. Esto ocasiona que los procesos de filtración, clarificación y cristalización en la producción de azúcar, se dificulten y que el rendimiento disminuya.

Fue principalmente en Francia y Alemania en donde se empezó a estudiar este problema y sus causas. W.B. Grove, reportó en 1884 que: "La goma producida por L. mesenteroides llamada en Francia "gomme de sucrerie" y "froschlauch" en Alemania, causa grandes pérdidas debido a la rápida producción de la goma que es insoluble, elástica, y cartilaginosa.

En 1897 Alfred Fischer, cita que los cambios químicos provocados por esta

bacteria se han denominado fermentación de dextrana produciéndose además, ácido láctico que acidifica el jugo de caña originalmente neutro.

Las investigaciones realizadas sobre la alteración que presentaba el azúcar crudo, condujo a la conclusión de que este problema no era ocasionado por un microorganismo específico, si no que la microflora existente era muy abundante.

La acción destructora de estos microorganismos se puede manifestar de dos modos principalmente:

- 1) Pérdidas de azúcar por inversión u oxidación.
- 2) Interferencia de los subproductos en el proceso de purificación.

Entre los polisacáridos que se han reportado como productos de una biosíntesis a partir de sacarosa, se encuentran principalmente, la dextrana y la levana, polímeros de glucosa y fructosa respectivamente.

Los polisacáridos microbianos han encontrado gran aplicación, debido a que la investigación en este campo ha permitido conocer la forma de obtener productos con diversas características y aplicaciones, como por ejemplo su uso en alimentos como viscosantes, agentes de textura y cuerpo, entre otros. La importancia que actualmente tienen los biopolímeros en la industria, ha originado que diversos proyectos se orienten hacia el azúcar de caña, una fuente de microorganismos productores de enzimas que utilizan como materia prima sacarosa para la síntesis de gomas. Este trabajo es parte de una línea de investigación que encuentra también su justificación en la urgente necesidad de la Industria Azucarera Nacional por diversificar el uso del azúcar, ya que el consumo de sacarosa como edulcorante calórico ha ido disminuyendo por el uso cada vez más frecuente de jarabes fructosados obtenidos a partir de almidón de maíz. Parte de su éxito se debe a que su precio fluctúa entre un 15-30% menos que el de la sacarosa

por la disponibilidad de materias primas y por el efecto sinérgico entre la fructosa y otros edulcorantes.

Esta situación ha venido a afectar notablemente la economía de países exportadores de azúcar, ya que mercados tan importantes como los Estados Unidos de Norteamérica, cada vez la utilizan menos.

Por tanto, la síntesis de biopolímeros a partir de sacarosa representa una forma de diversificación del uso del azúcar, además de ser un mercado en expansión con un gran potencial.

OBJETIVO

El objetivo de esta investigación es, el aislamiento de microorganismos de la caña de azúcar para la producción y caracterización de enzimas extracelulares relacionadas con la producción de polisacáridos a partir de sacarosa.

Para cumplir con el objetivo del proyecto, se realizó primeramente el aislamiento e identificación de microorganismos utilizando azúcar de caña como fuente natural. Posteriormente se procedió a la caracterización de las condiciones de fermentación para la producción de la actividad enzimática deseada. La enzima producida fue caracterizada en términos de actividad y reacciones de aceptor para la producción de oligosacáridos, estudiándose por último los productos de reacción y el efecto de diferentes métodos de degradación sobre los mismos, por medio de análisis con HPLC (cromatografía líquida de alta presión).

ANTECEDENTES

I. MICROBIOLOGÍA DEL AZÚCAR DE CAÑA

El origen de los estudios microbiológicos en la caña de azúcar, está íntimamente relacionado con la historia de la formación de masas mucilaginosas en los jugos de remolacha, problema que se empezó a estudiar principalmente en Francia y Alemania. Ésto afectaba seriamente los procesos de clarificación, filtración y cristalización en la fabricación de azúcar.

Hacia 1890 se aceptaba ya, de modo general, que un microorganismo llamado L. mesenteroides era una de las causas de formación de mucosidades. Sin embargo las investigaciones sobre la alteración de los azúcares crudos proporcionaron valiosos conocimientos sobre la flora microbiana del azúcar de toda la industria en general. Resultó evidente que la microflora era extensiva y que no se podía considerar un organismo específico como el causante de la alteración.

I.O. Microorganismos en la caña de azúcar

Los microorganismos presentes en la caña de azúcar provienen del suelo y de los desechos de las plantas decadentes.

La microflora existente en la caña es variable e influenciada principalmente por la temperatura, humedad y la temporada (Duncan y Colmer, (1964)).

Las bacterias que se encuentran comúnmente en las hojas y tallo de la caña son especies de *Flavobacterium*, *Lactobacillus*, *Xantomonas*, *Enterobacter* (probablemente *Klebsiella pneumoniae*, Nunez y Colmer, 1968), *Pseudomonas*,

Erwinia, *Leuconostoc*, *Bacillus* y *Corinobacterium*; algunas de las anteriores son potencialmente patogénicas para plantas. Algunas especies de hongos y levaduras también se encuentran.

2. Efecto del procesamiento de la caña en los microorganismos.

Las etapas generales en la fabricación de azúcar se resumen en la figura 1. La caña es procesada a azúcar crudo en una secuencia de operaciones (Moroz, 1963), la mayoría de las cuales afecta o se ve afectada por la microflora. La sacarosa está expuesta a la acción enzimática competidora de una multitud de microorganismos, desde el momento en que se corta la caña hasta el momento en que se clarifica el jugo extraído.

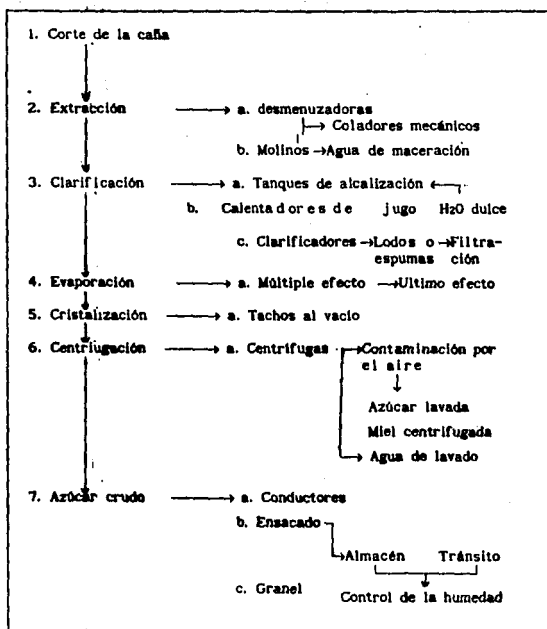


FIGURA: DIAGRAMA DE FABRICACION DE AZUCAR DE CAÑA

A continuación se mencionan cada una de las etapas en la fabricación del azúcar de caña y los microorganismos presentes en las mismas.

a) Cosecha

Hay diferentes métodos de cosecha de la caña y cada uno presenta ventajas y desventajas con respecto a la destrucción microbiana del azúcar de la caña cosechada.

La temperatura, la humedad y el tiempo desde el corte hasta la molienda, tienen también una gran influencia en la contaminación microbiana.

La quema de la caña para remover hojas, puede incrementar la temperatura del tallo de 55^o-85^oC. Aparentemente el quemado no destruye a muchos microorganismos termo-sensibles porque una gran variedad de ellos pueden encontrarse minutos después del quemado (Bevan y Bond, 1971). *Leuconostoc mesenteroides* ha sido encontrado en tallos, con una concentración igual, antes y después del quemado y se incrementa marcadamente con el tiempo después del quemado. Asimismo también se encuentran microorganismos esporulados.

La acidificación de la caña es el resultado del crecimiento de *Leuconostoc* y otras bacterias formadoras de ácido en la caña recién cosechada. Estos microorganismos producen azúcar invertido, ácido láctico y acético y, frecuentemente, dextrana.

b) Extracción

Afortunadamente, las condiciones del medio favorables para el desarrollo de los microorganismos en la fabricación de azúcar, están limitadas a un área particular: el ciclo de extracción.

El proceso de extracción comprende una operación de molienda en la que el tallo de la caña triturado o cortado en trozos pasa por una serie de molinos que exprimen el líquido que contiene. La mezcla de los jugos así obtenidos forma el llamado jugo mixto de la caña ó jugo crudo. Su densidad varía de 10 a 18 grados Brix a una temperatura de 25^o-30^oC, pH de 5.0-5.6; contienen abundantes sales orgánicas e inorgánicas, aminoácidos y otros nutrimentos.

Bajo estas condiciones los microorganismos formadores de dextrana como L. mesenteroides se adaptan fácilmente (Pederson y Hucker, 1946; Macleskey y col, 1947); los microorganismos catalasa negativos microaerófilos crecen bien, produciendo ácido, invertasa y dextrana.

Los microorganismos presentes en el jugo de caña pueden ser clasificados de acuerdo a su importancia económica en la fabricación de azúcar, como sigue:

-Bacterias:

1. Especies que destruyen la sacarosa sin formación de goma y las cuales son de importancia solamente en el jugo.
2. Especies formadoras de goma, en donde se incluye a las formadoras de dextrana como L. mesenteroides y las formadoras de levana pertenecientes al grupo mesentericus. Este grupo persiste a través del proceso entero de fabricación y puede causar inversión lenta de la sacarosa en jarabes y melazas.

3. Especies conocidas como termófilas las cuales se desarrollan a temperaturas entre 46° - 73° C, algunas veces son responsables del deterioro de los jugos clarificados calientes; generalmente se desarrollan en los filtros y contenedores del jugo.

-Hongos:

1. Especies con un poder de inversión muy fuerte; son activas en jugos así como en jarabes y son los causantes del deterioro más activo del azúcar crudo, ejemplos *Aspergillus repens* y *Aspergillus niger*.

2. Especies que producen una inversión ligera de la película de melaza que cubre los cristales de azúcar, además pueden producir pérdidas considerables de sacarosa en el jugo de caña, ejemplos: el grupo de *Citromyces* y *Monilia fusca* (Browne).

3. Especies que pueden ser encontradas en productos de azúcar pero que no tienen gran importancia económica.

-Levaduras:

1. Especies encontradas en el jugo crudo y que producen una inversión activa de sacarosa a esa densidad.

2. Especies de levaduras no esporuladas conocidas como *Torulae*, inducen a una destrucción activa de azúcares reductores y con frecuencia presentan una acción selectiva sobre fructosa, en jarabes, melazas y en la película que rodea los cristales de azúcar crudo.

La microbiología del jugo crudo ha sido reportada en numerosos estudios. Las bacterias más comunmente encontradas son especies de *Actinomyces*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Leuconostoc*,

Lactobacillus, *Micrococcus*, *Serratia*, *Streptomyces* y *Thermoactinomyces*. Las levaduras son *Saccharomyces*, *Torulopsis*, *Candida* y *Pichia spp.* Entre los hongos se encuentran *Aspergillus*, *Penicillium*, *Citromyces*, *Cladosporium* y *Monilia*.

La masa mucilaginosa es el producto final bacteriológico más grave que puede afectar la operación normal de un molino de caña.

En la tabla 1 se muestran algunas de las especies mencionadas en la literatura y el producto que forman.

TABLA 1. MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE GOMA QUE HAN SIDO AISLADOS EN LOS MOLINOS DE CAÑA DE AZUCAR

| Organismo | Producto | Investigador |
|-------------------------|----------|------------------------------------|
| <i>L. mesenteroides</i> | dextrana | Van Thieghman Cienkowski (1887) |
| <i>L. dextranicum</i> | dextrana | Beljerinck (1912) |
| <i>B. subtilis</i> | levana | Owen (1918) |

c) Operaciones subsecuentes

Las operaciones después de la extracción consisten en un tratamiento químico a alta temperatura llamado clarificación, seguido de sedimentación y filtración, la concentración del jugo clarificado y finalmente la cristalización del producto comercial.

La clarificación disminuye la cuenta microbiana en un 99.99%, pero la dextrana y muchas esporas bacterianas persisten.

La dextrana puede llegar a producir una solución demasiado viscosa y esto

puede taponar las tuberías interfiriendo en otras etapas del proceso incrementando el tiempo del mismo y disminuyendo la eficiencia en la clarificación y también la velocidad de cristalización dando como resultado cristales deformes.

Las bacterias que no forman esporas y las levaduras son destruidas fácilmente por el calor, mientras que las bacterias termófilas son eliminadas físicamente durante la clarificación y se encuentran en los lodos de sedimentación. La población general microbiana presente en el proceso de fabricación de azúcar su eliminación y las áreas de reincidencia se ilustran en la tabla 2.

**TABLA 2. POBLACION MICROBIANA GENERAL EN EL PROCESO DE
FABRICACION DE AZUCAR**

| Subproducto | Tipo de microorganismos | No./g |
|----------------------------|-------------------------------|---------|
| Jugo de la caña | Bacterias, levaduras y hongos | 280,000 |
| Jugo sulfitado | Bacterias, levaduras y hongos | 35,000 |
| Jugo alcalinizado | Bacterias principalmente | 37 |
| Jugo clarificado | Bacilos que forman esporas | 750 |
| Melaza evaporada | Bacilos que forman esporas | 400 |
| Masa cocida | Bacilos que forman esporas | 450 |
| Azúcar crudo | Bacilos que forman esporas | 600 |
| Melazas | Microflora mixta | 35,000 |
| Agua de lavado | Microflora mixta | 25,000 |
| Torta del filtro prensa | Microflora mixta | 150,000 |

NOTA: No./g= número de microorganismos por gramo de subproducto.

3. Microbiología del azúcar crudo de caña

El azúcar crudo se obtiene del jugo clarificado y evaporado. éste consiste de aproximadamente 98-99.3% de sacarosa en forma cristalina y de 0.5-2% de melazas, las cuales cubren los cristales.

Las melazas están constituidas de sacarosa, agua, azúcar invertido, ácidos orgánicos, aminoácidos y otros compuestos nitrogenados, minerales, cenizas, dextrana y otros polisacáridos.

La actividad de agua (a_w) debe ser de 0.65 ó menor y el valor de pH varía de 5.0 a 6.0.

El contenido microbiológico del azúcar crudo consiste de esporas de bacterias, levaduras y hongos. Algunas esporas están presentes porque resisten el proceso térmico y no son eliminadas durante la clarificación.

Las bacterias que se encuentran con más frecuencia son *Bacillus spp*; los siguientes microorganismos no crecen en el azúcar crudo pero pueden hacerlo en soluciones diluidas del mismo durante el proceso de refinamiento, *Desulfotomaculum (Clostridium) nigrificans*, *C. butyricum* y especies de *Bacillus* termofílicos, así como hongos de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Monilia*.

Las levaduras son principalmente osmófilas como *Saccharomyces rouxii* y *S. mellis*.

4. Microbiología del azúcar refinado

En el refinamiento del azúcar crudo a azúcar cristalino se desea remover impurezas y producir cristales de sacarosa con una pureza superior al 99.99%.

El jarabe empleado para la afinación puede contener un número considerable de esporas (Owen, 1977) pero el proceso total de afinación, defecación y filtración remueve gran parte de los microorganismos; otros pueden ser destruidos durante el mezclado a temperaturas de 70^o-90^oC.

Existen pocas oportunidades para el crecimiento microbiano en la secuencia principal de operaciones ya que la temperatura es muy alta y la actividad acuosa muy baja.

II. POLISACÁRIDOS PRODUCIDOS POR FERMENTACION

Los polisacáridos se presentan como reservas de energía y como materiales estructurales en pared celular y cápsulas extracelulares.

Los exopolisacáridos desempeñan distintas funciones, algunas de las posibles funciones se mencionan a continuación:

- Protección de los microorganismos en contra de la desecación;
- Como una barrera para prevenir el ataque de virus sobre sitios específicos en la pared celular;
- Como reservas de energía y carbono;
- Convertir el exceso de sustrato en espuma para que no sea metabolizable por otros microorganismos;
- Interacción con células de plantas ó animales en relaciones específicas simbióticas ó patogénicas.

La producción de polisacáridos de fuentes microbianas permite la síntesis controlada del polímero y un abastecimiento constante. En adición a lo anterior, los polisacáridos microbianos frecuentemente poseen propiedades físicas y químicas únicas, mejorando las características funcionales y disminuyendo la demanda biológica de oxígeno.

Una fermentación permite el crecimiento de organismos bajo condiciones ambientales precisamente definidas; ésto controla el proceso biosintético y permite manipular el tipo y especificaciones del producto. Cambios específicos en las condiciones de crecimiento pueden modificar el peso molecular y estructura de polímero resultante.

Diferentes polisacáridos microbianos son producidos hoy en día comercialmente. Como ejemplos podemos citar la dextrana, xantana, goma gelan, zanflo y politrán; muchos otros están en desarrollo.

1. Polisacáridos sintetizados a partir de sacarosa

Entre estos polisacáridos se encuentran principalmente la levana, la dextrana y la alternana, el primero es un homopolímero de fructosa y los dos últimos de glucosa.

A. Levanas

Las levanas son homopolímeros constituidos de unidades de D-fructofuranosa unidas principalmente por enlaces $\beta(2 \rightarrow 6)$. También existen enlaces $\beta(2 \rightarrow 1)$ en un radio de aproximadamente un punto de ramificación cada nueve unidades de D-fructosil.

Los pesos moleculares de las levanas son extremadamente altos. Se han obtenido valores de 17 a 67 millones (Feingold y Gebatia 1957) para la levana producida por *Aerobacter levanicum*, y arriba de 100 millones para la producida por *Bacillus subtilis*.

Diferentes especies de *Bacillus* producen la enzima extracelular responsable de la síntesis de la levana a partir de sacarosa, entre los microorganismo que han sido reportados como productores de levana se encuentran: *B. subtilis*, *Acetobacter*, *Acromobacter*, *Aerobacter*, *Arthrobacter* y *Azotobacter*.

la levansacarasa se ha realizado a partir de cultivos de *Bacillus subtilis*.

En la cepa de *B. subtilis* utilizada por Dedonder (1960), la levansacarasa es inducible. Puede ser inducida en los cultivos donde la fuente de carbono es el glicerol y por sacarosa en concentraciones de $2 \times 10^{-2} M$ a $0.5 M$. Estos autores sugieren que la sacarosa induce a una permeasa responsable de la excreción de la levansacarasa. Estos autores también pusieron en evidencia la importancia del hierro en el medio de cultivo del microorganismo, encontrando que en ausencia de hierro la actividad de levansacarasa extracelular es tres veces menor y no hay relación entre el crecimiento de *Bacillus subtilis* y la actividad enzimática del sobrenadante del cultivo.

El estudio de la producción de la levansacarasa ha sido realizado con otros microorganismos inducibles tales como *Acetobacter suboxydans* var. *levanicum* (Elisashvili, 1974) y *Gluconobacter oxydans* (Tkachenko y Loitsyanskaya, 1976, 1978).

A.3 Usos de las levanas

La aplicación de las levanas no ha tenido un desarrollo comparable al de las dextranas; una posible aplicación de las de peso molecular de 65 000 daltons es en medicina como sustituto de plasma sanguíneo (Hestrin y col., 1956).

Otro uso potencial es en fotografía en donde se puede emplear en la fabricación de emulsiones foto-sensibles (Chambers y Overman, 1964).

B. Dextrana

Dextrana es el nombre que se da a una gran variedad de polisacáridos bacterianos extracelulares, compuestos casi exclusivamente de unidades monoméricas de α -D-glucopiranosas, unidas principalmente por enlaces $\alpha(1 \rightarrow 6)$. Existe una gran cantidad de dextranas con estructuras que varían en su grado de ramificación (Alsop, 1983), y con una gama de pesos

B.2. Mecanismo de reacción de la enzima dextranasa

El mecanismo de reacción de la dextranasa ha sido descrito por Robyt y col., (1974). El mecanismo postula la presencia de dos formas activas de complejación de la enzima; enzima-glucosa y enzima-dextrana.

Cada nueva glucosa incorporada a la dextrana, se agrega al complejo enzima-dextrana mediante un ataque nucleofílico del oxígeno de carbono 6 de la glucosa al carbono 1 del dextrano, para formar el enlace $\alpha(1\rightarrow6)$. Esta nueva unidad de glucosa, proveniente del complejo enzima-glucosa, se agrega al complejo enzima-dextrana, justamente en el punto de unión, al mismo tiempo que una nueva molécula de sacarosa es hidrolizada para dar lugar al complejo enzima-glucosa, la cadena de dextrana crece así, en principio indefinidamente, solo la presencia de aceptores detiene el crecimiento.

B.3. Usos de la dextrana

Debido al gran número de aplicaciones que se han encontrado y las modificaciones que se les han hecho, las dextranas se convierten en el polisacárido microbiano más estudiado hasta la fecha.

Entre las aplicaciones de la dextrana nativa se encuentran:

En alimentos, como estabilizador y viscosante en jarabes, concentrados de jugos cítricos, procesamiento de frutas, preservación de alimentos (película protectora), composición de helados, etc.

Otros usos son: en la recuperación secundaria de petróleo, la estabilización de agregados de suelo, la composición de floculantes en productos de papel, la fabricación de suturas quirúrgicas, etc.

D. Reacciones en presencia de aceptor

Se ha encontrado que glucansacarosas extracelulares de varias fuentes bacterianas, incluyendo *L.mesenteroides*, catalizan la transferencia de grupos glucosil de sacarosa a azúcares aceptores de bajo peso molecular, formándose una serie de oligosacáridos.

Roby y Walseth (1978) describieron el mecanismo por el cual las reacciones de aceptor se llevan a cabo y concluyen que sirven para finalizar la polimerización de dextrana.

Hay diferentes carbohidratos que pueden actuar como aceptores en la reacción de la dextransacarasa. Una lista de 27 compuestos ha sido publicada (Roby 1980). La maltosa e isomaltosa son los más activos.

Como la dextransacarasa, la alternansacarasa forma en presencia de sacarosa y aceptores, productos de peso molecular bajo, denominados oligoalternanos (Cot y Roby 1982). Estos autores demostraron que en presencia de maltosa se forman un trisacárido y dos tetrasacáridos.

III. CONDICIONES DE FERMENTACIÓN PARA LA OPTIMA PRODUCCION ENZIMATICA.

Tsuchiya (1952) descubrió los efectos de ciertos factores en el medio de cultivo sobre la producción de dextransacarasa de *L. mesenteroides*. En primera instancia confirmó que la sacarosa es esencial para la producción enzimática.

El organismo puede crecer en medios con glucosa, fructosa o maltosa, pero sin inducción de la dextransacarasa. Encontró también que al incrementar los niveles de sacarosa progresivamente de 0.5% a 5% incrementaba el

rendimiento de la enzima pero que a concentraciones mayores a 2% en sacarosa las soluciones se tornaban muy viscosas dificultando la separación de las células, debido a que la enzima una vez en el medio y en presencia de sacarosa, iniciaba la producción de dextrana.

En el estudio del pH sobre la producción enzimática se encontró que el máximo rendimiento se logra a un pH de 6.7 y dentro del intervalo de temperatura 20-29°C, el máximo rendimiento enzimático se encontró a 23°C.

Hasta hace poco estas condiciones se consideraban como las óptimas para la producción de la dextransacarasa, sin embargo, los trabajos realizados por Schneider (1980) y por López y Monsan (1980) resultaron en condiciones de producción que dan lugar a niveles más elevados de dextransacarasa.

-pH del medio de fermentación

Para establecer las condiciones óptimas de pH en la producción de la enzima es necesario conocer la influencia del pH en la producción, actividad y estabilidad enzimática. Koepsell (1952) encontró que el pH óptimo para la producción enzimática es de 6.5-7.0, para la actividad y estabilidad, 5.0-5.2, además es relativamente inestable a 6.7.

-Temperatura

La regulación de la temperatura durante la fermentación es también un parámetro crítico e independiente del pH. Koepsell (1952) reportó un pH óptimo igual a 6.7 para la producción enzimática, sin embargo, este resultado corresponde cuando temperatura es de 23°C. Bergey (1974) reporta que la formación de dextrana a partir de sacarosa es favorecida a una temperatura de 20-25°C. El valor óptimo para el crecimiento del microorganismo es de 30°C, sin embargo resulta demasiado alto para una máxima producción enzimática, por su baja estabilidad.

Aisop (1983) realizó el estudio del grado de aireación sobre las fermentaciones de producción enzimática, concluyendo que con oxígeno puro y bióxido de carbono saturado el crecimiento termina rápidamente y con O₂ y algo de aireación (50%) se incrementa el crecimiento.

-Fuente de carbono

Las cepas de L. mesenteroides utilizan un gran número de carbohidratos, sin embargo, la sacarosa es el único sustrato que induce la producción de la enzima y también es el único utilizable para la síntesis de dextranas.

Para una producción económica de la enzima con altos rendimientos se encontró que es necesario mantener un nivel bajo en sacrosa (5-10 g/l) a lo largo de la fermentación. Monsan y López (1981), desarrollaron un sistema de fermentación retroalimentada, que permite mantener baja la concentración de sacarosa en el medio eliminando el fenómeno de represión catabólica e incrementando la producción de enzima de 7 a 8 veces.

-Fuente de nitrógeno y factores de crecimiento

Normalmente las fuentes de nitrógeno fundamental que se han utilizado para el crecimiento de L. mesenteroides han sido el líquido de remojo del maíz y el extracto de levadura. Estos materiales complejos proveen los factores de crecimiento requeridos.

-Fosfato

Ha sido utilizado usualmente en forma de K₂HPO₄ como ingrediente tanto en la preparación del inóculo como en la producción de la enzima y de la dextrana, en cantidades que van de 0.1 a 2.0%. Proporciona capacidad amortiguadora al medio de cultivo.

-Elementos traza

El uso de extracto de levadura o líquido de remojo del maíz supuestamente proporciona los elementos traza necesarios, sin embargo, en los medios de fermentación reportados en la literatura existe una suplementación de ciertos elementos.

Se trata de una mezcla de Mg^{2+} , Na^+ , Fe^{2+} y Mn^{2+} conocida como sales "R". En años recientes se ha hecho hincapié en la importancia del calcio en la preparación y acción de la dextransacarasa. Monsan (1978) estableció que la presencia de 0.05% de $CaCl_2$ estabiliza las soluciones enzimáticas. A. López (1980) demostró que el medio de fermentación preparado con 0.005% de $CaCl_2$ no presenta ninguna modificación en la actividad, ni aún aumentando a 0.05%, empero, la actividad de la enzima purificada es notablemente afectada.

MATERIAL Y METODOS

I. AISLAMIENTO E IDENTIFICACION

1. Aislamiento

Utilizando azúcar mascabado como fuente natural de aislamiento, se trató como se indica a continuación:

Se colocaron en un matraz erlenmeyer de 1000 ml, 30g de azúcar mascabado con 300 ml de caldo nutritivo y se incubó por un periodo de 48 hr a 35°C.

Al término de la incubación se tomó una asada del medio anterior y se sembró por estria en placas de agar nutritivo más 2% de sacarosa con la finalidad de lograr el aislamiento directo de colonias. Se incubaron a 30°C por 24 hr.

Las colonias aisladas y con mayor crecimiento se observaron al microscopio y se procedió a realizar diluciones sucesivas de 10^{-1} a 10^{-6} en solución salina 0.9%. Se sembró 0.1 ml de cada una de las diluciones por adsorción en placas de agar sacarosa más 0.005% de polimixina B. Se incubaron a 30°C por 24 hr.

Las colonias aisladas y puras (aspecto gomoso y características similares), se sembraron por picadura en agar nutritivo en tubo inclinado. Después de la incubación, se mantuvieron en refrigeración a 4°C, hasta el momento de ser utilizadas para producir el inóculo de fermentación.

En la figura 1 se resume las etapas seguidas para el aislamiento.

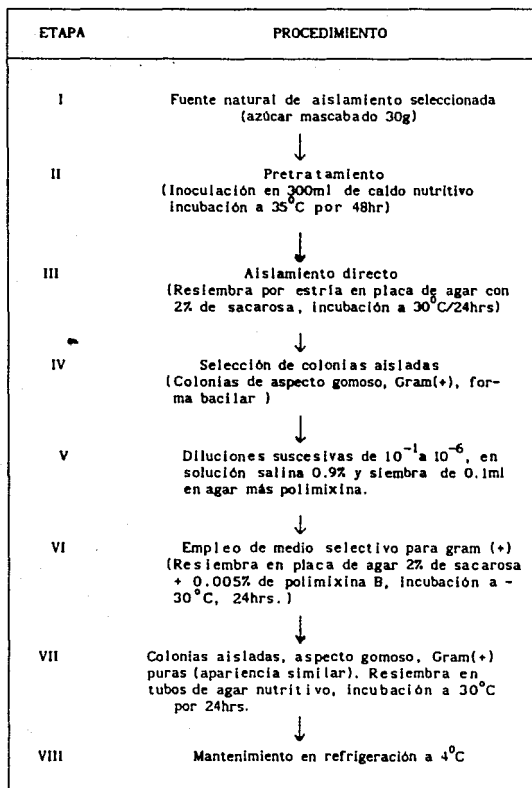


FIGURA 2. ETAPAS PARA LA REALIZACION DEL AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS DE AZUCAR MASCABADO DE CAÑA

2. Identificación

La identificación se realizó siguiendo el esquema propuesto por Mac Faddin (1981) para determinación de género y el propuesto por R.C.W. Berkeley y Col. (1986) con apoyo de las características bioquímicas reportadas en Bergey's Manual, para la determinación de especie.

A) DETERMINACION DE GENERO

Se realizaron las siguientes pruebas:

1.-Características morfológicas por observación microscópica

- a) Forma del microorganismo
- b) Tipo de agrupación
- c) Presencia de esporas
- d) Gram

2.-Características metabólicas

- a) Prueba de Catalasa
- b) Crecimiento en agar anaeróbico

B) DETERMINACION DE ESPECIE

Para la determinación de especie se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas.

- Determinación de cápsula
- Movilidad
- Tamaño de células
- Voges-Proskauer
- Acido de: D-glucosa, L-arabinosa, D-xilosa y D-manitol
- Gas de glucosa

- Hidrólisis de: caseína, gelatina y almidón
- Fenilalanina deaminasa
- Reacción de lecitinasa en yema de huevo
- Reducción de nitratos
- Formación de indol
- Ureasa
- Utilización de citrato
- Crecimiento en caldo nutritivo a pH de: 6.8 y 5.7
- Crecimiento en NaCl: 5% y 7%
- Crecimiento a: 10, 30, 40, 50, 55 y 60°C

II. PRODUCCION DE LA ENZIMA

1. Medio de cultivo

Se empleó para todas la fermentaciones realizadas y desarrollo del inóculo, el medio propuesto por Tsuchiga y Col, (1952), que para fines de simplificar la redacción se nombró como (A).

La composición de este medio se especifica en la tabla 3.

TABLA 3. COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO (A)

| Compuesto | g/l |
|----------------------|--------------------|
| sacarosa | 20 |
| extracto de levadura | 20 |
| K_2HPO_4 | 20 |
| $MgSO_4$ | 2×10^{-1} |
| $CaCl_2$ | 5×10^{-2} |
| NaCl | 1×10^{-4} |
| $MnSO_4$ | 1×10^{-4} |
| $FeSO_4$ | 1×10^{-4} |
| + H_2O | 1 l |
| pH= 6.8 - 7.0 | |

Para la sobreproducción de enzimas del tipo glucosiltransferasas se empleo la técnica descrita por López y Monsan (1981), la fermentación retroalimentada se llevó a cabo mediante la adición de sacarosa a una concentración de 40g/l y se adicionaron 20g/l de maltosa.

- Influencia de la fuente de carbono empleada en el medio de fermentación en la producción de la enzima.

En este punto se varió solamente la concentración y tipo de fuente de carbono empleada, permaneciendo constantes los demás componentes del medio. Las fuentes estudiadas fueron lactosa, glucosa y sacarosa a una concentración del 4%.

2. Desarrollo del inóculo

El microorganismo aislado conservado en refrigeración en agar nutritivo, se inoculó en el medio líquido (A) y se creció por 8 hr a 30°C y 100 rpm. Terminado el tiempo de incubación se colocaron 2 ml del medio en frascos viales que contenían 2 ml de glicerol estéril al 30%. Se conservaron en congelación y se utilizaron para realizar un inóculo al 10% para las fermentaciones subsecuentes.

Se efectuaron experimentos con una cepa de colección L. mesenteroides NRRL B-1355 aislada de la caña de azúcar y reportada como productora de dos glucosil transferasas (Cot y Robyt, 1982).

La cepa de colección estaba liofilizada y solamente se resuspendió en el medio líquido y se realizó lo mismo que para la cepa aislada.

2. Condiciones de fermentación

La fermentación líquida para el caso del microorganismo aislado e identificado se realizó en matraces Erlenmeyer de 500 ml con un volumen de 200 ml de medio (A), bajo las siguientes condiciones:

- Temperatura controlada a 30°C
- Agitación de 100 rpm en agitadora orbital con control de temperatura.
- pH inicial del medio de cultivo: 6.8-7.0, sin control del mismo.
- Tiempo aproximado de fermentación: 8-10hr.

La cepa L. mesenteroides NRRL B-1355, se creció como describen López y Monsan (1981), para la cepa L. mesenteroides B-512. Se realizó una fermentación retroalimentada con regulación de pH, en un fermentador de 5 l marca LH fermentation 2000 serie I, bajo las siguientes condiciones:

- Temperatura controlada a 28°C
- Agitación de 300 rpm
- Aireación de 1 vvm

-pH inicial de 6.8 a controlar en 5.7 con una solución de sacarosa de 400g/l en NaOH 2N.

-Tiempo de fermentación aproximado de 6-8hr.

3. Controles durante la fermentación

Se muestreó cada hora determinando crecimiento celular por estimación de la D.O. a 650 nm en un espectrofotómetro UV Vis marca Perkin Elmer Lambda 3A de una muestra diluida 10 veces con agua destilada y el pH en un pH metro marca Beckman.

Al final de la fermentación se ajustó el pH a 5.2 con ácido o-fosfórico y se centrifugó a 10,000 rpm, T= +4°C en una centrifuga marca Janetzki K24.

El sobrenadante libre de células se almacenó en refrigeración, para la determinación de actividad enzimática.

4. Determinación de actividad enzimática

La actividad total de glucosiltransferasa y de fructosiltransferasa (con eventual contaminación de invertasa) se estimó por medición de los azúcares reductores liberados en una reacción en presencia de 10% de sacarosa, pH=5.2, T=30°C, por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Summer and Howell, 1935).

La dilución del sobrenadante para la estimación de la actividad debe permitir lecturas de D.O. a 540 nm en un rango de 0.2-1.0.

5. Definición de unidades de actividad

Una unidad de actividad (U.I.) se definió como la cantidad de enzima que hidroliza una micromol de sacarosa por minuto bajo las condiciones siguientes: T(°C)=30, conc. de sacarosa 10%, pH=5.2, en buffer acetatos.

6. Determinación de proteína soluble total

La proteína soluble total se cuantificó siguiendo el método simplificado de Lowry (Peterson, 1977).

La curva estandar de albúmina sérica bovina (BSA) quedó descrita por la ecuación:

$$D.O._{750nm} = (0.00385 \text{ ml/mg de BSA}) (\text{mgBSA/ml}) + 0.0306$$

Con un coeficiente de correlación $r^2 = 0.9989$

III. PURIFICACION DE LA ENZIMA

1. Purificación por aplicación del sistema concentración-purificación, por extracción líquido-líquido con PEG.

Se utilizó el método reportado por Paul y col. (1984), utilizando PEG (PM=15000). Se agregó al sobrenadante de fermentación libre de células una solución de PEG al 50% hasta observar la precipitación. Se recuperó el precipitado por centrifugación a 8000 rpm por 10 min. La fase PEG superior se eliminó, la fase polimérica inferior se recupera con buffer acetatos 0.05M pH=5.2, y se mantiene en refrigeración a 4°C.

2. Purificación por cromatografía de filtración en gel

Después de concentrar y purificar la enzima por precipitación con PEG, se realizó la purificación por filtración en gel. Una muestra de 0.7 ml de preparación enzimática, se eluyó con buffer acetatos 0.05M pH=5.2 por una columna de 65 ml de volumen, empacada con Biogel A-5M (agarosa 5 millones). Las fracciones se colectaron y se les determinó absorbancia a 280 nm, utilizando un colector con detector integrado U.V 280 nm marca LKB Bromma 2211 superrac, 2158 UVI Cords.

3. Purificación por fraccionamiento con sulfato de amonio

El sobrenadante de fermentación libre de células, se colocó en un baño de hielo controlando la temperatura a 4°C.

Se agregó progresivamente sulfato de amonio para obtener grados de saturación en intervalos de 10% desde 0 hasta 70%. Cada una de las fracciones precipitadas se recuperó por centrifugación a 8000 rpm 10 minutos y se conservó en buffer acetatos pH=5.2 a 4°C.

4. Purificación por tratamiento térmico

La enzima producida por L. mesenteroides NRRL B-1355 después de la extracción con PEG se sometió la enzima a un calentamiento a 45°C por 30 minutos, de acuerdo a lo reportado por López-Mungula y col.(198).

IV. CONDICIONES DE SINTESIS ENZIMÁTICA

La reacción de síntesis se realizó utilizando diferentes concentraciones de enzima en buffer acetatos pH=5.2, con 10% de sacarosa. Para la reacción en presencia de aceptor, se adicionó 5% de maltosa.

V. ANALISIS DE POLIMERO Y DE AZUCARES

Los polímeros se recuperaron por precipitación con etanol a una concentración final del 50% (Cot y Robyt, 1982); se secaron en una estufa de vacío a una temperatura de 40°C por 12 hrs.

Los polímeros en estudio se sometieron a dos tratamientos de hidrólisis.

a) Tratamiento con dextranasa

Se preparó una solución de 1g/l de polímero en buffer acetatos 0.05M pH=5.2 y se agregaron 50 U/ml de dextranasa Amano comercial. La temperatura se controló a 40°C.

b) Hidrólisis ácida

El tratamiento ácido se realizó sobre una solución de 17g/l de polímero empleando H_2SO_4 2.4N (Perlot, 1980). El procedimiento se especifica a continuación:

A 5 ml de la solución de polímero se le adicionó 1 ml de H_2SO_4 2.4N. Se calentó a 55°C por 20 minutos. Al término del calentamiento se neutralizó la reacción con NaOH y se analizaron los productos de hidrólisis por HPLC.

Los azúcares y oligosacáridos fueron analizados por HPLC (cromatografía líquida de alta presión) empleando una columna fase inversa C-18 y la columna Altex μ -Spherogel Carbohydrate, equipadas con un refractómetro diferencial.

Las condiciones de operación se especifican en los cromatogramas correspondientes.

VI. Procedencia de los reactivos utilizados

Todos los reactivos empleados fueron grado analítico (R.A)

-Enzimas empleadas:

Dextranasa comercial (Amano)

Alternansacarasa (BioEurope)

Dextransacarasa procedente de la cepa *L. mesenteroides* NRRL B-512

Dextrana T 70-Pharmacia AB Uppsala Sweden.

RESULTADOS Y DISCUSION

En el presente trabajo se incluyen los resultados del estudio de la actividad enzimática extracelular de dos cepas, una de colección que fue L.mesenteroides NRRL-B1355 y otra aislada de azúcar mascabado e identificada como B.circulans. Ambas cepas producen enzimas que actúan sobre sacarosa, pero mientras que la primera forma polímeros de glucosa, la segunda lo hace de fructosa.

Los resultados se dividen para su exposición, en dos partes, en la primera parte se incluyen los resultados de la cepa aislada y en la segunda, los de la cepa de colección. De esta forma, se plantean dos alternativas de transformación enzimática de la sacarosa hacia dos polímeros de características químicas diferentes.

PARTE I: PRODUCCION, PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE LA

FRUCTOSILTRANSFERASA PRODUCIDA POR B. circulans.

I. Aislamiento e identificación

1. AISLAMIENTO

El criterio utilizado para realizar el aislamiento, fue la obtención de un microorganismo capaz de crecer en agar sacarosa en forma amplia y rápida produciendo colonias de aspecto gomoso.

Definiendo al aislamiento como la separación de un microorganismo particular de una población presente en la fuente natural de la cual es aislado, se realizaron las siguientes etapas para lograrlo:

1. Pretratamiento

La fuente natural de aislamiento (azúcar mascabado) se dispersó en caldo nutritivo con la finalidad de realizar un enriquecimiento y favorecer el crecimiento de los microorganismos presentes.

Después de incubar a 35°C por 48 hrs, se obtuvo una mezcla de microorganismos, que por observación microscópica se definieron como bacilos Gram(+), bacilos Gram(-) y cocos.

2. Aislamiento directo

Se tomó una asada del medio de enriquecimiento y se sembró por estria en placas de agar al 2% de sacarosa para favorecer la dilución del inóculo. Después de 24 hrs de incubación a 30°C se obtuvieron colonias aisladas. Las que presentaron mayor crecimiento y aspecto gomoso, se observaron al microscopio, encontrándose la presencia abundante de microorganismos de forma bacilar, capsulados, Gram(+); pero también escasos bacilos Gram(-).

3. Utilización de medio selectivo

Con la finalidad de eliminar a los microorganismos Gram(-) se realizaron diluciones sucesivas de 10⁻¹ a 10⁻⁶ en solución salina de una de las colonias antes aisladas y se sembró en agar sacarosa con polimixina que inhibe a los microorganismos Gram(-).

Finalmente se obtuvo un cultivo puro que presentó las siguientes características: forma bacilar, capsulado, gram(+), móvil y esporulado con producción de un sobrenadante viscoso al crecer en sacarosa.

Una vez logrado el aislamiento, siguiendo las etapas necesarias para obtener un cultivo de características deseadas, como crecimiento sobre agar sacarosa produciendo colonias de aspecto gomoso, se procedió a la identificación.

2. IDENTIFICACION

a) Determinación de género

Siguiendo el esquema propuesto por Mac Faddin (1980) para la determinación de género, se obtuvieron los siguientes resultados:

Características morfológicas: Forma bacilar,

agrupación en cadenas

presencia de esporas terminales

Gram(+)

Características metabólicas: catalasa (+)

anaerobio facultativo

Agrupando las características anteriores se llegó a la conclusión de que el microorganismo pertenece al género *Bacillus*.

En la figura 3 se presenta el esquema que resume los resultados obtenidos para la etapa de identificación del microorganismo aislado.

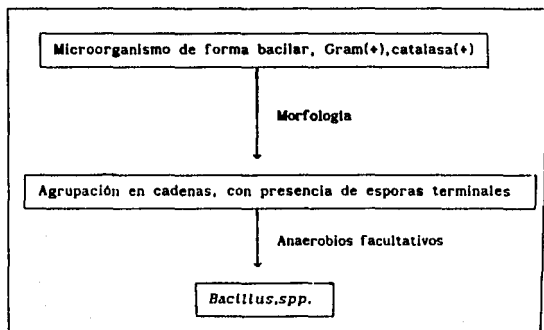


FIGURA 3: ESQUEMA PARA DETERMINACION DE GENERO

Conociendo las etapas generales involucradas en la fabricación de azúcar y el tipo de microflora capaz de crecer durante cada una de las mismas, cabría esperar que por las condiciones utilizadas en la elaboración de azúcar mascabado, como son tratamiento a altas temperaturas, los microorganismos capaces de resistir esto son predominantemente los esporulados. Dentro de los microorganismos que han sido reportados se encuentran las especies siguientes: *Bacillus*, *Actinomyces*, *Enterobacter*, *Leuconostoc*, etc.

Por tanto el microorganismo aislado que pertenece a la especie *Bacillus* se puede encontrar dentro de la flora del azúcar mascabado.

b) Determinación de especie

La determinación de especie se realizó siguiendo la marcha propuesta por R.C.W. Berkeley y col., (1984) para la identificación de *Bacillus sp.*, con apoyo de las características bioquímicas reportadas en Bergey's Manual (1986).

Comparando las características bioquímicas reportadas para 17 especies diferentes de *Bacillus* se encontró, que el microorganismo más semejante al de estudio es *B.circulans*.

En la tabla 4 se presenta el resultado de un estudio comparativo de las características encontradas para el microorganismo aislado y las reportadas para *B. circulans*, mientras que la figura 4 resume la marcha propuesta por R.C.W. Berkeley en 1984, para la determinación de *Bacillus sp.*

TABLA 4. ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DE *B. circulans* Y DEL MICROORGANISMO AISLADO

| Característica | Microorganismo aislado | <i>B. circulans</i> |
|-------------------------------|------------------------|---------------------|
| Gram | + | v |
| cápsula | + | + |
| movilidad | + | v ⁺ |
| catalasa | + | + |
| crecimiento en agar anaerobio | + | d |
| Voges-Proskauer | - | - |
| ácido de : | | |
| D-glucosa | + | + |
| L-arabinosa | - | + |
| D-xilosa | + | + |
| D-mantol | - | + |
| gas de glucosa | - | - |

**TABLA 4 CONT. ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS CARACTERISTICAS
BIOQUIMICAS DE *B. circulans* Y DEL MICROORGANISMO AISLADO.**

| | | |
|--|---|---|
| hidrólisis de: | | |
| almidón | + | + |
| caseína | - | d |
| gelatina | + | d |
| fenilalanina deaminasa | - | - |
| reacción de lecitinasa | + | - |
| reducción de nitratos | + | d |
| formación de indol | - | - |
| ureasa | - | - |
| utilización de citrato | - | - |
| crecimiento en caldo nutritivo a pH : | | |
| 6.8 | + | + |
| 5.8 | + | d |
| crecimiento en NaCl: | | |
| 5% | + | d |
| 7% | + | d |
| crecimiento a: | | |
| 10 ^o C | + | d |
| 30 | + | + |
| 40 | + | + |
| 50 | + | - |
| 55 | - | - |
| 65 | - | - |
| v=variable, d=11-89% de las cepas son + | | |
| Nota: Las características de <i>B. circulans</i> se tomaron del Bergey's Manual (vol.2.1986). | | |

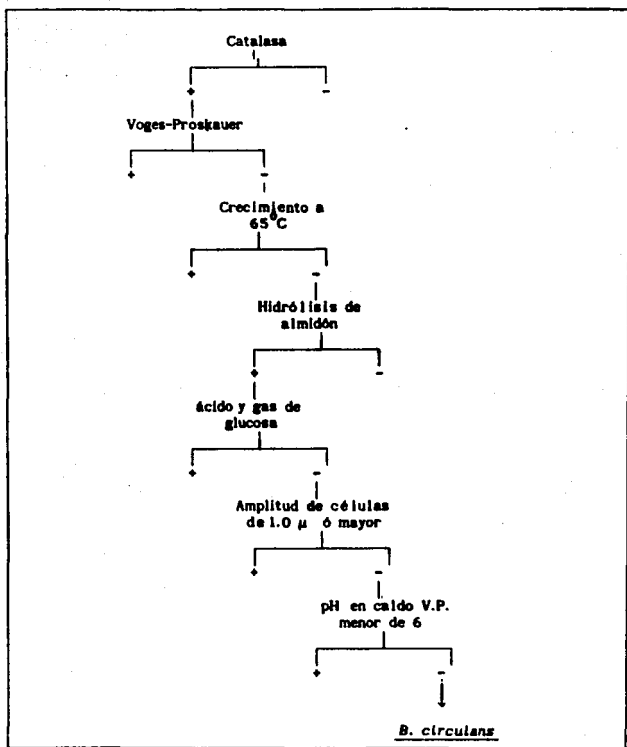


FIGURA 4. ESQUEMA PARA DETERMINACION DE ESPECIE

Nota: Los resultados de las pruebas realizadas se muestran con negritas.

Analizando los resultados de la tabla 3, se puede observar que el microorganismo aislado presenta un 87% de las características reportadas para *Bacillus circulans*, el cual es un microorganismo gram(+), móvil, esporulado, capsulado, cuya especie ha sido encontrada como contaminante en el azúcar crudo de caña.

Sin embargo lo interesante de estos resultados es que, *B. circulans* no ha sido reportado como productor de algún exopolisacárido o de alguna glucosiltransferasa.

II. Producción, purificación y caracterización de la actividad enzimática extracelular.

I. CARACTERIZACION DE LA CINETICA DE FERMENTACION

El criterio utilizado para la selección de un medio de cultivo específico, fue que se pudiera inducir la producción de la enzima extracelular que cataliza la síntesis del polisacárido utilizando sacarosa como materia prima.

Se utilizó el medio (A) propuesto por Tsuchiya y col,(1952) reportado para la máxima producción de glucosiltransferasa de *L.mesenteroides* y se determinó la cinética de fermentación por medición del crecimiento microbiano y la variación de pH cada hora. Los resultados se muestran en la figura 5. Cabe hacer notar que en esta fermentación el control de pH no es necesario ya que prácticamente permanece constante. También se puede observar que el tiempo de fermentación es de aproximadamente 9 hrs.

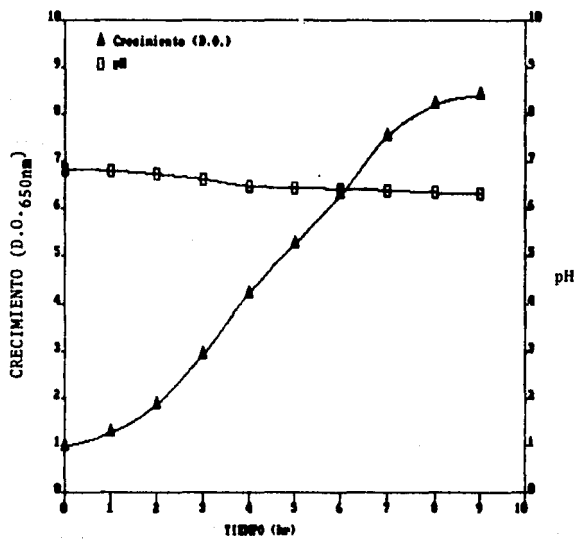


FIGURA 5. CINETICA DE CRECIMIENTO DE *B. circulans*

Al final de la fermentación, se eliminaron las células y se estimó la actividad enzimática presente en el sobrenadante de fermentación. El sobrenadante presentó una actividad de 3.16 U.I./ml.

2. CARACTERIZACIÓN DE LA PRODUCCION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DURANTE LA FERMENTACION.

Con el fin de determinar la relación existente entre el crecimiento y la producción de la actividad enzimática se realizó una fermentación siguiendo el crecimiento microbiano y determinando la actividad enzimática durante la fermentación.

En la figura 6 se muestran los resultados obtenidos para este punto. En ésta, se observa que la máxima producción de actividad enzimática se tiene al final de la fase logarítmica de crecimiento, aproximadamente después de 8hrs de fermentación, lo cual nos indica que esta enzima se encuentra asociada al crecimiento ya que su producción se efectúa poco después de las dos horas de fermentación, también se encontró que en la fase estacionaria hay disminución de la actividad, probablemente debido a la presencia de enzimas proteolíticas o a una baja estabilidad de la enzima.

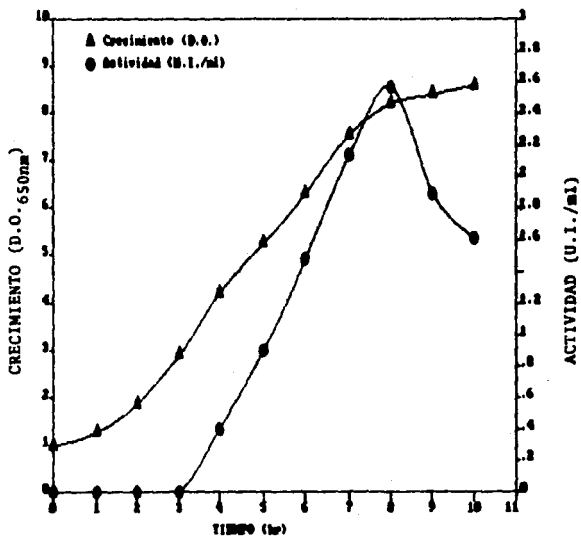


FIGURA 6. CARACTERIZACION DE LA PRODUCCION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DURANTE LA FERMENTACION DE *B. circulans*

Un modelo frecuentemente empleado para explicar la formación de productos biotecnológicos, es el de Luedeking-Piret, dado por la siguiente ecuación:

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dx}{dt} + \beta x \dots \text{ec. (1)}$$

$$\left[\begin{array}{c} \text{Cantidad de producto} \\ \text{asociado al} \\ \text{crecimiento} \end{array} \right] + \left[\begin{array}{c} \text{Cantidad de producto} \\ \text{asociado a la} \\ \text{concentración de} \\ \text{celulas} \end{array} \right]$$

Dividiendo ambos miembros de la ecuación (1) entre x , tenemos:

$$\frac{1}{x} \frac{dP}{dt} = \alpha \frac{1}{x} \frac{dx}{dt} + \beta \dots \text{ec. (2)}$$

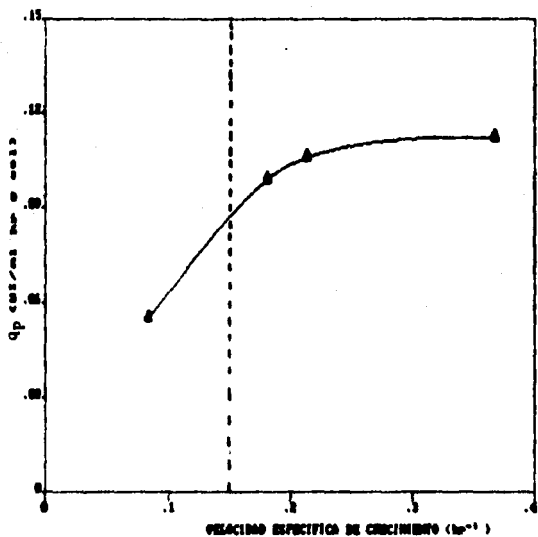
El lado izquierdo de la ecuación (2) define la velocidad específica de formación de producto (q_p), mientras que el lado derecho está compuesto por un primer término correspondiente a la velocidad específica de crecimiento (μ) con α y β como constantes.

Organizando la ecuación (2) se tiene:

$$q_p = \alpha \mu + \beta$$

En la figura 7 se presenta el resultado de aplicar este modelo a los datos experimentales de actividad enzimática contra crecimiento en el proceso.

En esta figura se puede observar que para un valor aproximado de μ igual a 0.15, q_p es independiente de la velocidad de crecimiento, dependiendo únicamente de la cantidad de células presente.



**FIGURA 7. REPRESENTACION GRAFICA DEL MODELO DE LUEDEXING-PIRET
 APLICADO A LOS DATOS DE PRODUCCION DE ACTIVIDAD ENZIMATICA
 CONTRA CRECIMIENTO EN EL PROCESO**

NOTA: q_p = velocidad específica de formación de enzima

3. RELACION ENTRE EL pH DE CRECIMIENTO Y PRODUCCION DE LA ENZIMA

Una vez encontrando que la actividad enzimática se encuentra asociada al crecimiento se estudió la influencia que tiene el pH de crecimiento en la producción de la enzima.

Para determinar el pH de crecimiento óptimo para la producción de la enzima se realizaron cuatro fermentaciones de pH inicial 6.5, 7, 7.5 y 8.0 respectivamente.

En la figura 8 se muestran los resultados obtenidos.

El pH óptimo de crecimiento del microorganismo fue de 7 y consecuentemente se obtuvo que la máxima actividad enzimática se tiene empleando como pH inicial de fermentación un valor de 7, lo cual es lógico si se piensa que el microorganismo prácticamente no produce ácido y por tanto cabría esperar que creciera más eficientemente a un pH cercano a la neutralidad.

Aunque el pH inicial en el rango de valores estudiados no tiene una influencia significativa en la velocidad específica de crecimiento, se observó que por el contrario, la actividad enzimática producida, si se ve claramente afectada.

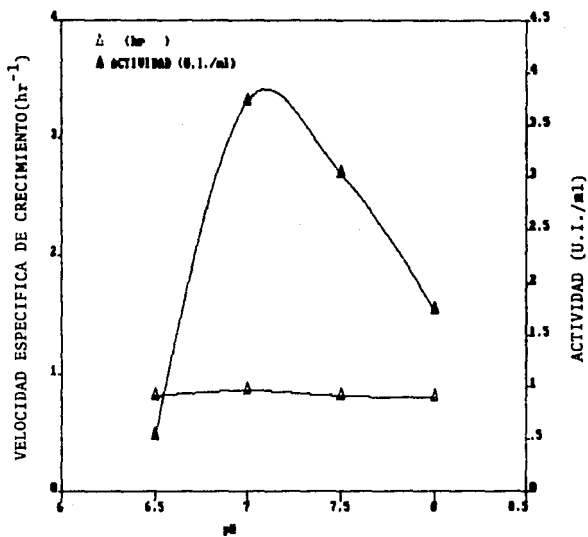


FIGURA 8. RELACION ENTRE pH DE CRECIMIENTO Y PRODUCCION DE LA ENZIMA

4. EFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO UTILIZADA EN EL MEDIO DE FERMENTACION EN LA PRODUCCION DE LA ENZIMA.

En este punto se pretendió conocer el efecto que tiene el utilizar diferentes fuentes de carbono sobre la producción de enzima.

Se realizaron 3 fermentaciones utilizando como fuente de carbono sacarosa, glucosa y lactosa al 4% respectivamente.

En la tabla 5 se muestran los resultados al medir la actividad enzimática en los diferentes sobrenadantes de fermentación.

Se puede observar que la actividad enzimática estudiada sólo se presenta cuando se utiliza sacarosa como fuente de carbono, lo cual indica que esta enzima aparentemente, es inducible por la sacarosa y no por la glucosa y la lactosa. Este comportamiento coincide con el de las dextranacarasas de *L. mesenteroides*.

A este respecto, convendría efectuar otros estudios utilizando una variedad más amplia de fuentes de carbono para poder concluir si efectivamente sólo la sacarosa induce a la producción de la enzima.

TABLA 5. EFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO
EN LA PRODUCCION DE ENZIMA

| Fuente de carbono | Actividad(U.I./ml) |
|-------------------|--------------------|
| sacarosa | 3.21 |
| glucosa | ----- |
| lactosa | ----- |

III. Purificación de la enzima

Partiendo de la hipótesis de que la enzima producida en el medio de fermentación era una dextranasa, se purificó empleando primeramente polietilenglicol y se procedió a hacer un análisis por medio de HPLC de los azúcares residuales de la reacción enzimática.

Por el mecanismo de reacción de la dextranasa se hubiera esperado que apareciera fructosa solamente, pues la glucosa es empleada en la formación del polímero.

La figura 9 muestra el análisis de los azúcares generados durante la reacción enzimática. En dicha figura se puede observar que aparecen tanto glucosa como fructosa, lo que puede deberse a una contaminación de la enzima con invertasa, problema frecuentemente encontrado en los casos de microorganismos productores de dextranasa. Sin embargo en un sistema dextranasa-invertasa debería haber al final más fructosa que glucosa, mientras que en el caso de la figura 9 la concentración de fructosa resulta ser considerablemente inferior a la de glucosa. Esta situación inversa es decir una enzima que polimeriza a la fructosa y deja a la glucosa en solución es factible si en el medio se cuenta con una fructosiltransferasa de tipo levansacasa, que además se encuentre contaminada con invertasa.

Para verificar la hipótesis de trabajo anterior, es necesario purificar la actividad estudiada con la finalidad de separar las dos enzimas. Para este efecto se aplican las técnicas de (a) Purificación con PEG, (b) precipitación con sulfato de amonio y (c) cromatografía por filtración en gel.

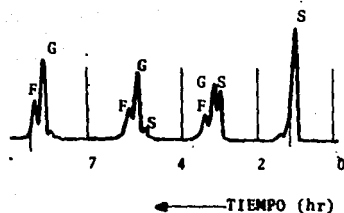


FIGURA 9. EVOLUCION DE LA REACCION DE SINTESIS

Condiciones: pH de 5.2, [sacarosa]=10%,

NOTA: F=fructosa, G=glucosa, S=sacarosa

a) PURIFICACION PARCIAL EMPLEANDO UN SISTEMA DE EXTRACCION LIQUIDO-LIQUIDO CON POLIETILENGLICOL (PEG).

Siguiendo la metodología propuesta por Paul y col.,1984, para la purificación de dextran sacarasa producida por *L.mesenteroides* NRRL-8512 utilizando PEG, al sobrenadante de fermentación libre de células y a un pH=5.2 se le agregó paulatinamente una solución de PEG (PM=1500) al 50% hasta observar la formación de dos fases, lo que ocurre cuando el PEG alcanza una concentración del 25%.

Esta técnica se basa en la formación de dos fases líquidas en soluciones de PEG y polisacáridos como las dextranas o bien con sales como el K_2HPO_4 . Las proteínas migran a la fase PEG y pueden así separarse de otros componentes del medio de cultivo. En el caso muy particular de la dextran sacarasa, el mecanismo de reacción es tal, que la enzima siempre tiene dextrana adherida covalentemente de forma que en los sistemas PEG-dextrana, la enzima migra a

la fase dextrana, mientras que las otras proteínas pasan a la fase PEG. Esto genera un muy elevado nivel de purificación de esta enzima por esta técnica a tal grado que podría catalogarse como de afinidad. Por esta razón se decidió explorar la aplicación de esta técnica a la fructosiltransferasa estudiada.

Se supone entonces que en el mecanismo de síntesis del polímero también para esta enzima se forma un complejo enzima-polímero y al agregar el PEG hasta una cierta concentración se presenta una partición acuosa de dos fases, una fase de PEG rica en proteínas del sobrenadante y la fase polimérica en la cual se presenta la actividad. Se determinó la actividad en las dos fases y se calculó el rendimiento en la extracción. Los resultados se presentan en la tabla 6.

TABLA 6. PURIFICACION DE LA ENZIMA PRODUCIDA POR *B. circulans* MEDIANTE EXTRACCION CON PEG

| | Volumen (ml) | Actividad (U.I./ml) | [proteína] (mg/ml) | Rendimiento de actividad (%) |
|---------------|-----------------|------------------------|-----------------------|------------------------------------|
| Sobrenadante | 300 | 2.12 | 9.77 | 100 |
| Fase PEG | 600 | 0.00 | n.d | 0 |
| Fase polímero | 54 | 10.90 | 0.40 | 92.4 |

De los datos reportados en la tabla 6, se tiene que el 92.4% de la actividad enzimática migra hacia la fase polimérica, por lo que se puede decir que la eficiencia de extracción con PEG es bastante buena y como lo indica el balance de actividad, no se reporta actividad en la fase PEG.

b) PURIFICACION POR PRECIPITACION FRACCIONADA UTILIZANDO SULFATO DE AMONIO.

Un volumen de 200 ml del sobrenadante de fermentación con una actividad total inicial de 893.24 U.I mantenido a 4°C, se trató con sulfato de amonio.

Esta técnica ampliamente usada se basa en las diferencias de solubilidad que presentan las proteínas a distintas concentraciones de agentes precipitantes como el sulfato de amonio (salting out).

Con tal finalidad se sometió el sobrenadante de fermentación libre de células a un tratamiento con sulfato de amonio, como lo muestran los datos de la tabla 7, la precipitación de proteína se presentó desde un 20 hasta un 70% de saturación de sulfato de amonio. Además se encontró que cada una de las fracciones precipitadas presenta actividad como se muestra en la tabla 7.

TABLA 7. PURIFICACION CON SULFATO DE AMONIO DEL SOBRENADANTE DE FERMENTACION DE *B. circulans* .

| Fracción | % de saturación de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | Actividad (U.I) | Recuperación (%) |
|----------|---|-----------------|------------------|
| 1 | 0 - 10 | 0.00 | - |
| 2 | 10 - 20 | 0.00 | - |
| 3 | 20 - 30 | 8.36 | 0.93 |
| 4 | 30 - 40 | 25.09 | 2.81 |
| 5 | 40 - 50 | 54.97 | 6.15 |
| 6 | 50 - 60 | 33.51 | 3.75 |
| 7 | 60 - 70 | 100.35 | 11.23 |
| | TOTAL | 222.26 | 24.89 |

Nota: Volumen inicial del sobrenadante fue de 200 ml. Cada fracción (3 a 7) se recuperó en un volumen de 20 ml.

**TABLA 8. RENDIMIENTO DE ACTIVIDAD DE LA PURIFICACION
CON SULFATO DE AMONIO**

| | Volumen (ml) | Actividad (U.I./ml) | Rendimiento de actividad (%) |
|------------------------------------|-----------------|------------------------|------------------------------------|
| Sobrenadante de fermentación | 200 | 4.46 | 100 |
| Final de re- cuperación | 100 | 2.22 | 24.8 |

Como un criterio para definir o caracterizar el tipo de actividad presente en cada una de las fracciones se realizó un análisis de los productos de reacción formados durante una reacción en presencia de 10% de sacarosa bajo las condiciones anteriormente especificadas.

Como se muestra en los cromatogramas en HPLC del (a) al (d) en la figura 10, la actividad encontrada fue similar para cada fracción, encontrándose la formación de fructosa y glucosa en el medio de reacción, no habiéndose logrado separación alguna en la precipitación. Aunque con este método se esperaba que la enzima precipitara en una sola fracción a una cierta concentración del sulfato de amonio, lo anterior puede deberse a la posibilidad de que la enzima se encuentre en diversos estados de agregación, dando como resultado la precipitación a distintas concentraciones del agente precipitante y por tanto que la técnica no de buenos resultados.

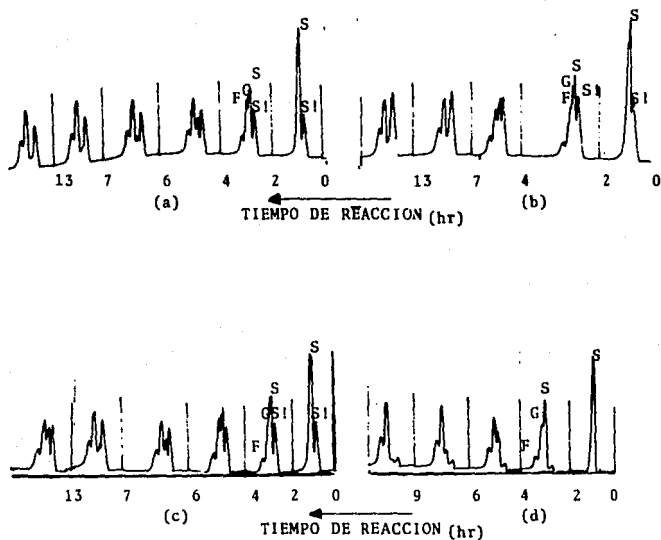


FIGURA 10. ANALISIS DE LOS PRODUCTOS DE REACCION DE LAS DIFERENTES

FRACCIONES ENZIMATICAS PRECIPITADAS CON SULFATO DE AMONIO

Cromatogramas obtenidos en una reacción con 10% de sacarosa. Cromatograma: (a) fracción precipitada con 40% de saturación de sulfato de amonio, (b) fracción precipitada con 40-50%, (c) fracción precipitada con 50-60% y (d) fracción precipitada con 60-70%. Nota: Si = sulfato de amonio, S = sacarosa, F = fructosa, G = glucosa.

c) PURIFICACION POR CROMATOGRAFIA DE FILTRACION EN GEL

Después de purificada con PEG, la enzima concentrada se purificó por filtración en gel de acuerdo con las condiciones reportadas en materiales y métodos. Los resultados se resumen en las tabla 9 y el diagrama de elución se muestra en la figura 11.

TABLA 9. PURIFICACION DE LA ENZIMA DE *B. circulans*
POR FILTRACION EN GEL

| | Volumen (ml) | Actividad (U.I./ml) | A.T. (U.I) | [proteína] (mg/m) | A.E (U/mg) | F.P | R (%) |
|------------------|-----------------|------------------------|---------------|----------------------|---------------|-----|----------|
| Fase polimero | 0.7 | 6.53 | 4.57 | 0.26 | 25.1 | 1 | - |
| Frac.1 | 12 | 0.24 | 2.92 | 6.5×10^{-3} | 37.4 | 1.5 | 64 |

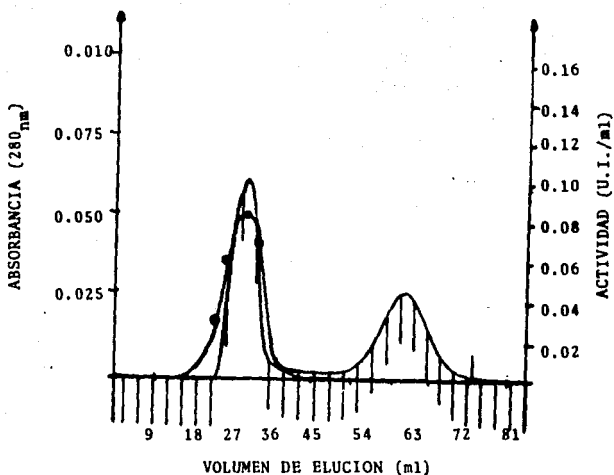
A.T= Actividad total

F.P= Factor de purificación

A.E= Actividad específica

R= Rendimiento de actividad

En la tabla 9 se puede observar que en la purificación por este método basada en la separación de las proteínas por su peso molecular, se obtuvo un rendimiento de 64% con un factor de purificación de 1.5. Aunque aparentemente la cromatografía por filtración en gel se podría considerar como un método eficiente para la purificación, no se puede concluir que la etapa aporte algo al proceso de purificación, dado el alto nivel alcanzado con la extracción en PEG, pues debe recordarse la especificidad de la técnica.



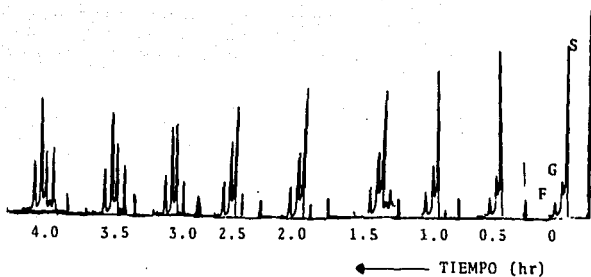
**FIGURA 11. DIAGRAMA DE FILTRACION EN GEL DE LA ENZIMA
 PRODUCIDA POR B. circulans**

Condiciones de operación: 0.7ml de solución de enzima purificada con PEG, se eluyeron por una columna de agarosa (A-5M) de 65ml de volumen, con buffer acetatos 0.05M, pH de 5.2.

Como se observa en la figura 11, el cromatograma de filtración en gel de la enzima presenta 2 fracciones que absorben a 280 nm. Sin embargo, la actividad enzimática está presente solamente en la primera fracción correspondiente al volumen muerto determinado por la dextrana azul y al 42% de la proteína total aplicada a la columna. Esto nos indica que el peso molecular de la enzima es mayor de 5 millones que es el rango de exclusión del soporte utilizado (agarosa ASM). Con esto se puede decir que, la enzima se encuentra seguramente en diversos estados de agregación lo que hace que se comporte como una macromolécula, lo anterior también se observó en la purificación utilizando sulfato de amonio ya que la enzima precipita en distintas fracciones y no en una sola como se esperaría. Esta situación ha sido reportada por López (1980) para la dextranasacarasa y sirve como base para su purificación.

Los productos de reacción en presencia de la enzima purificada por esta técnica se analizaron con la finalidad de conocer si se había logrado purificar una actividad específica o se tenía la misma actividad estudiada hasta el momento. En el cromatograma de la figura 12 se pueden observar los resultados.

Se observa que la enzima presenta el mismo comportamiento de la enzima purificada con los métodos anteriores. Después de estos intentos de separar ambas enzimas se planteó con mayor nivel de probabilidad que la actividad de invertasa, pudiese ser inherente a la actividad de fructosiltransferasa en *B. circulans*. A continuación se incluye una tabla en donde se observa el desarrollo de la síntesis mediante el seguimiento de la concentración de sacarosa, glucosa y fructosa durante la reacción.



**FIGURA 12. PRODUCTOS DE REACCION DE LA ENZIMA PURIFICADA CON PEG
Y FILTRACION EN GEL.**

Condiciones: columna para análisis de carbonatos, temperatura de 50 C, eluyente agua, flujo 0.5 ml/min, IR de 32.

TABLA 10. EVOLUCION DE LOS PRODUCTOS DE REACCION DE LA ENZIMA DE B. circulans PURIFICADA POR FILTRACION EN GEL.

| Tiempo (hr) | [sacarosa] (%) | [glucosa] (%) | [fructosa] (%) |
|-------------|----------------|---------------|----------------|
| 0.0 | 10.0 | 0.92 | 0.5 |
| 0.3 | 9.7 | 1.16 | 0.62 |
| 1.0 | 8.4 | 1.38 | 0.73 |
| 1.3 | 7.3 | 1.48 | 0.81 |
| 2.0 | 6.8 | 1.76 | 0.92 |
| 2.3 | 6.3 | 2.03 | 1.04 |
| 3.0 | 5.2 | 2.40 | 1.14 |
| 3.3 | 4.1 | 2.50 | 1.25 |
| 4.0 | 3.4 | 2.60 | 1.30 |

En la tabla 10 se puede observar claramente que, la proporción en la que la glucosa y la fructosa se van presentando guarda una relación aproximada de 2 a 1., con lo anterior se puede corroborar que durante la reacción parte de la fructosa se emplea en la formación de algún compuesto que no es detectado en el análisis y que de acuerdo a nuestra hipótesis corresponde al biopolímero del tipo de las levanas.

Dado el comportamiento de la proteína en la precipitación y en la filtración en gel, la conclusión aparente es que tratamos con una sola enzima con las dos actividades.

IV. Caracterización enzimática

En este punto se incluyen los resultados de la caracterización cinética de la enzima en estudio, así como de sus productos, utilizando como criterios el tratamiento del polímero sintetizado con endodextranasa y con ácido, así como el análisis de los productos de reacción por cromatografía líquida.

1. CINÉTICA ENZIMÁTICA

a) Determinación de la temperatura óptima de actividad

Se realizó un ensayo determinando actividad para diferentes temperaturas a un pH de 5.2. Los resultados se muestran en la figura 13, en donde se puede observar que la temperatura óptima para la enzima es de 40°C a un pH=5.2. También se encontró que a temperaturas mayores se presenta una caída rápida de la actividad.

b) Determinación de pH óptimo de actividad.

Conociendo la temperatura óptima se realizó un ensayo para determinar el pH óptimo a la temperatura óptima encontrada. Los resultados se muestran en la figura 14, donde se observa que el pH óptimo de actividad es de 7. Sin embargo, también se puede ver que el rango de pH donde la enzima presenta actividad abarca desde 5 hasta 10 teniéndose actividades muy semejantes en el rango de 6 y 8.5.

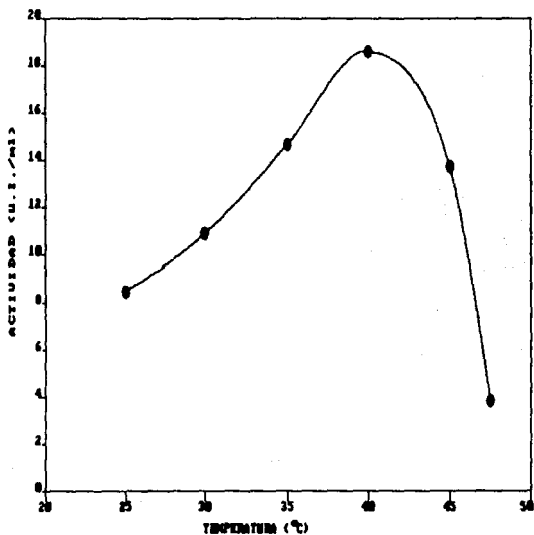


FIGURA 13. DETERMINACION DE LA TEMPERATURA OPTIMA DE ACTIVIDAD
 DE LA ENZIMA PRODUCIDA POR *B. circulans*
 Condiciones: enzima purificada con PEG pH de 5.2,
 [sacarosa] de 10%

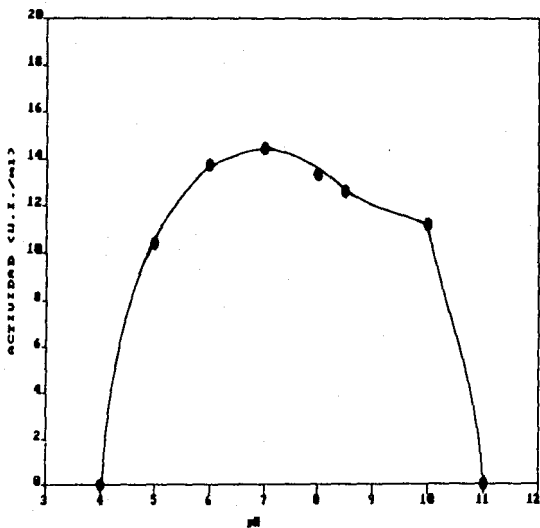


FIGURA 14. DETERMINACION DEL pH OPTIMO DE ACTIVIDAD

Condiciones: Temperatura de 40°C. [sacarosa] de 10%

2. CARACTERIZACION

a) Tratamiento del polímero sintetizado con endodextranasa y con ácido

Se realizó una síntesis de polímero y se recuperó por precipitación con etanol al 50%. El precipitado se secó y se trató primeramente con una endodextranasa. El objetivo de este experimento era el descartar de forma definitiva el que se tratase de una dextranosa. No se detectó hidrólisis, concluyéndose que el polímero producido no era dextrana. Se procedió a hacer una hidrólisis ácida con H_2SO_4 2.4N, los productos de la hidrólisis se analizaron por cromatografía líquida de alta presión. Los resultados se muestran en el cromatograma de la figura 15.



FIGURA 15. CROMATOGRAMA EN HPLC DE LOS PRODUCTOS DE LA HIDROLISIS ACIDA DEL POLIMERO SINTETIZADO

NOTA: SA = sulfato de sodio producto de la neutralización del H_2SO_4
F = fructosa

Se puede observar que el polímero hidrolizado presenta solamente fructosa que fue detectada con un tiempo de elución de 18 minutos lo que es una prueba contundente y definitiva de que el carbohidrato sintetizado por la enzima está constituido por unidades de fructosa, tratándose de una fructosiltransferasa.

b) Caracterización de la reacción de síntesis por determinación de los productos de reacción

Se realizó una reacción de síntesis en presencia de 10% de sacarosa bajo las condiciones anteriormente establecidas y se hizo una primera estimación del curso de la reacción por determinación del poder reductor generado durante la reacción por el método del DNS obteniéndose los resultados que se muestran en la tabla II.

TABLA II. EVOLUCION DE LA REACCION DE SINTESIS DE LA ENZIMA DE

B. circulans PURIFICADA CON PEG

| tiempo (hr) | poder reductor como glucosa (mg/ml) |
|-------------|-------------------------------------|
| 0 | 3,7 |
| 2 | 51 |
| 4 | 72 |
| 6 | 74 |
| 7 | 74 |

CONDICIONES DE REACCION: Temperatura 30°C, pH de 5,2, sacarosa al 10% en buffer acetatos, 68.4 ULS/ml.

Se observó que la concentración final de reductores es de 74 mg/ml. Cabe señalar que en el caso de haberse tenido una invertasa pura, se hubiera generado un poder reductor equivalente a 105 mg/ml del azúcar reductor.

Los productos de la reacción de síntesis fueron analizados por cromatografía líquida y los resultados se muestran en el cromatograma de la figura 16.

Como podemos observar, al final de la reacción se observa la aparición de glucosa y fructosa, esta última en menor proporción, como ya se había mencionado. Con el fin de efectuar un balance de materia sobre el sistema, al término de la reacción se hidrolizó el producto encontrándose que los 31 mg/ml de azúcares faltantes, constituyen el biopolímero.

En el sistema enzimático producido el 59% del sustrato es transformado a goma, mientras que el 41% restante es invertido sin que la actividad invertasa y fructosiltransferasa puedan separarse por las técnicas clásicas de precipitación con sulfato de amonio o la técnica más específica, casi de afinidad en este caso, de partición en fase líquida con PEG.

El sistema aislado permite entonces contar con una enzima fructosiltransferasa aunque deben hacerse esfuerzos por eliminar, probablemente por inhibición selectiva, la actividad invertasa.

PARTE II: PRODUCCION DE LA ALTERNANSACARASA DE *L. mesenteroides* NRRL-B1355

Considerando que el objetivo del presente proyecto era el estudio y caracterización de glucosiltransferasas de microorganismos aislados de la caña de azúcar, al detectar que el microorganismo producía una fructosiltransferasa se desarrolló paralelamente la caracterización de una glucosiltransferasa de un microorganismo de colección. Considerando los trabajos realizados por el grupo del Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química de la UNAM y el proyecto global de producción de glucosiltransferasa de la Facultad de Química, el CIIGB y la compañía BioEuropa en Francia, se seleccionó la cepa *L. mesenteroides* NRRL B-1355 y se decidió reproducir las condiciones para la producción de esta enzima y su aplicación en la síntesis de oligosacáridos de estructura diferente a la clásica (cepa *L. mesenteroides* B-512).

I. Condiciones de fermentación

Las condiciones de fermentación son las empleadas por Cot y Robyt (1982), para la producción de alternansacarasa.

Se creció *L. mesenteroides* realizando una fermentación de 3 l retroalimentada utilizando el medio A con 4% de sacarosa y 2% de maltosa esta última con la finalidad de evitar la formación de polímero insoluble en el medio, controlando el pH una vez alcanzado el valor de 5.7, con una solución de sacarosa alcalina.

La evolución de la fermentación se siguió determinando el crecimiento microbiano por medición de la D.O a 650 nm. Los resultados se muestran en la figura 17.

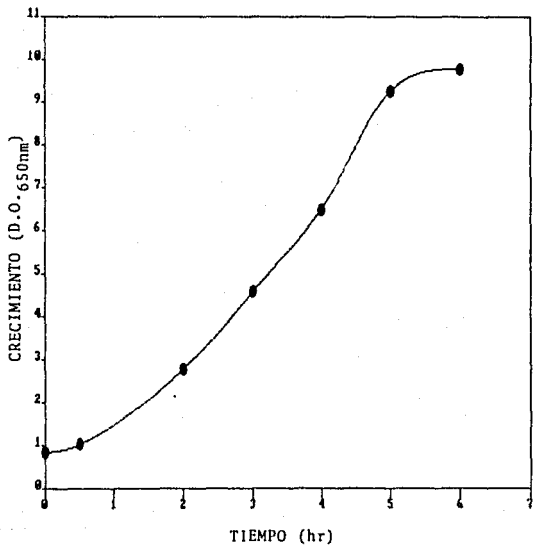


FIGURA 17. CINETICA DE CRECIMIENTO

DE

L. mesenteroides NRRL-B1355

Se puede observar que el tiempo de fermentación fue de 6 hrs, teniéndose una μ (velocidad específica de crecimiento) de 0.423 hr^{-1} .

El sobrenadante de fermentación presentó una actividad total de glucosiltransferasa de 0.5 U.I./ml.

II. Purificación de la enzima alternansacarasa

La purificación de la alternansacarasa se realizó en dos etapas, la primera fue utilizando una extracción líquido-líquido con PEG del sobrenadante de fermentación y una segunda etapa utilizando la propiedad de la alternansacarasa de resistencia al tratamiento térmico. En la extracción con PEG se logró recuperar un 99% de la actividad producida. En la tabla 12 se muestran los resultados.

TABLA 12. PURIFICACION DE LA GLUCOSILTRANSFERASA PRODUCIDA POR

L. mesenteroides NRRL-1355 UTILIZANDO PEG

| Fase | Volumen (ml) | Actividad (U.I) | Recuperación (%) |
|------------------------------|--------------|-----------------|------------------|
| Sobrenadante de fermentación | 2570 | 1222 | 100 |
| PEG | 3600 | 0 | 0 |
| Polímero | 250 | 1221 | 99 |

L. mesenteroides NRRL-B1355 produce cuando crece en presencia de sacarosa

dos glucosiltransferasas, una dextranasa capaz de producir dextrana de estructura similar a la producida por *L.mesenteroides* NRRL B-512F y una segunda enzima que ha sido llamada alternansacarasa (E.C.2.4.1.140) (López y Monsan, 1981.).

Como se muestra en la tabla 13, la actividad de glucosiltransferasa producida en el sobrenadante de fermentación disminuyó casi un 50% al ser tratada térmicamente a 45°C por 30 min. Con lo anterior se pensaba tener solamente a la alternansacarasa que se caracterizaría posteriormente dada su mayor termoestabilidad.

TABLA 13. PURIFICACION POR MEDIO DE TRATAMIENTO TERMICO DE LA ALTERNANSACARASA PRODUCIDA POR *L. mesenteroides* B-1355

| Actividad inicial (U.I/ml) | Actividad después del tratamiento (U.I/ml) | Rendimiento de actividad (%) |
|----------------------------|--|------------------------------|
| 4.88 | 2.68 | 55 |

III. Caracterización de alternansacarasa

Los criterios utilizados para caracterizar a la alternansacarasa, fueron la acción de enzimas de degradación como la dextranasa, sobre los polímeros y oligosacáridos sintetizados. Otro criterio fue el análisis de los productos de reacción en presencia de maltosa haciendo una comparación con los productos de enzimas provenientes de otras cepas.

1. Estimación de la concentración de dextrana en una mezcla de polímeros.

Con la finalidad de conocer la cantidad de dextrana sintetizada en una mezcla de polímeros producto de la síntesis de la enzima antes y después del tratamiento térmico se realizó una comparación utilizando como referencia el poder reductor generado por una dextrana comercial (T70) al ser tratada con dextranasa y comparando con el generado al tratar los polímeros sintetizados.

El producto de la síntesis con la enzima sin tratamiento térmico presenta un 46% de dextrana y el polímero de la síntesis con la enzima tratada térmicamente presentó un 25% de dextrana. Esto último se explica por la actividad residual de dextransacarasa presente al no haber sido el tratamiento lo suficientemente efectivo para eliminar lo mejor posible esta actividad.

El criterio anterior puede ser empleado para conocer la efectividad del tratamiento térmico en la purificación de la alternansacarasa ya que a medida que la cantidad de dextrana sintetizada disminuya, se puede decir si la alternansacarasa está más pura. La tabla 14 muestra los resultados obtenidos.

TABLA 14. ESTIMACION DE LA CONCENTRACION DE DEXTRANA EN UNA MEZCLA DE POLIMEROS

| Producto | Δ Absorbancia (g/l) | [Dextrana] (%) |
|----------------|----------------------------|----------------|
| Dextrana T70 | 0.342 | 100 |
| Dextrana 1355 | 0.158 | 46.2 |
| Alternano 1355 | 0.087 | 25.4 |

2. Análisis de los productos de la reacción de aceptor en presencia de maltosa

Además de utilizar como criterio de caracterización el efecto de la dextranasa sobre el polímero sintetizado por la enzima después de ser tratada térmicamente, se realizó un estudio de los productos formados en la reacción de síntesis en presencia de maltosa como aceptor utilizando HPLC y el efecto de la dextranasa sobre los oligosacáridos sintetizados.

Robyt y Walseth en 1978, describieron el mecanismo por el cual las reacciones de aceptor se llevan a cabo y concluyen que sirven para finalizar la polimerización, esto último permite obtener productos de bajo peso molecular que pueden ser estudiados por un análisis en HPLC.

Analizando los cromatogramas de los productos de la reacción en presencia de aceptor obtenidos con diferentes preparaciones enzimáticas que fueron : enzima del sobrenadante de fermentación de *L. mesenteroides* NRRL-B1355, alternansacarasa térmicamente tratada, alternansacarasa purificada (BioEurope) y la dextranasa de *L. mesenteroides* NRRL B-512F, tenemos que como se muestra en el cromatograma de la figura 18, utilizando la enzima del sobrenadante de fermentación, se forman los oligodextranos denominados como DP₃, DP₄ y DP₅, resultantes de la transferencia a maltosa en enlaces $\alpha(1\rightarrow6)$ de 1, 2 y 3 moléculas de glucosa respectivamente y los oligoalternanos DP₃, G₃, G₄ y G₅ resultantes de la transferencia de glucosa a la panosa (DP₃) en enlaces $\alpha(1\rightarrow6)$ y $\alpha(1\rightarrow3)$. Al ser estos productos tratados con dextranasa los oligodextranos DP₄ y DP₅ prácticamente desaparecen, lo cual es lógico ya que la dextranasa actúa sobre los enlaces $\alpha(1\rightarrow6)$, en cambio los oligoalternanos permanecen prácticamente constantes ya que presentan enlaces $\alpha(1\rightarrow3)$ que son resistentes a esta actividad hidrolítica.

En el cromatograma 19 se puede observar los productos formados al emplear la enzima térmicamente tratada, presentando diferentes proporciones ya que la concentración de los oligodextranos fue menor que para el caso de la enzima sin tratamiento y la concentración de los oligoalternanos permaneció constante. Al ser tratados con dextranasa los oligodextranos son hidrolizados mientras que los oligoalternanos presentan diferentes comportamientos. El oligoalternano G_4 si se ve afectado por la dextranasa, mientras que el G_3 y G_5 son más resistentes.

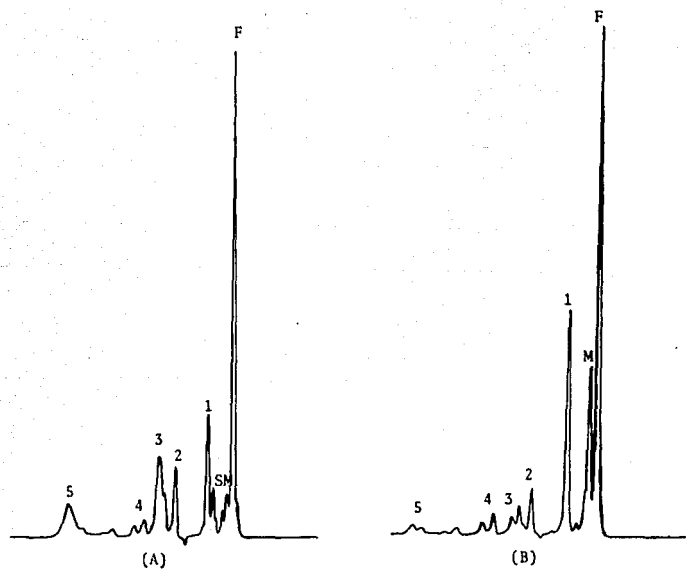
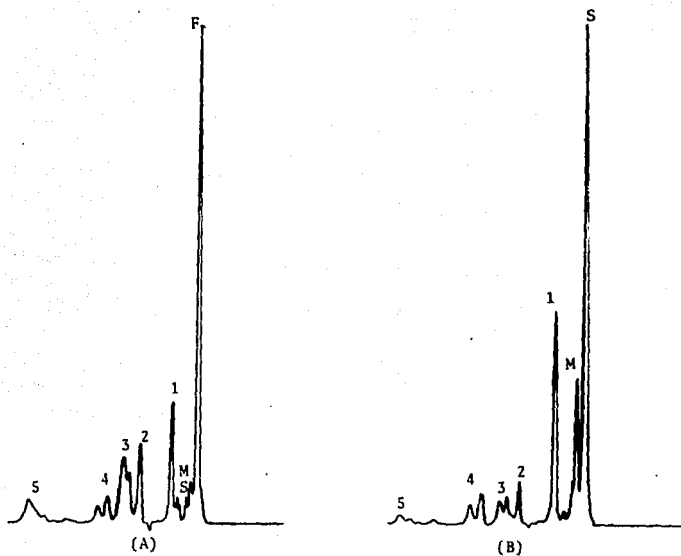


FIGURA 18. PRODUCTOS DE REACCIÓN DE ACEPTOR DE LA ENZIMA
 PRODUCIDA POR *L. mesenteroides* B-1355 SIN TRATAMIENTO TÉRMICO

(A) Productos de reacción; (B) tratamiento con dextranasa

NOTA: F=fructosa, S=sacarosa, M=maltosa, 1=panosa (DP3), 2=oligoaltermán (G3), 3=oligodextrán (DP4) y oligoaltermán (G4), 4=oligoaltermános (G5), 5=oligodextrano (DP5).



**FIGURA 19. CROMATOGRAMA DE LA REACCION EN PRESENCIA DE ACCEPTOR
DE LA ENZIMA PRODUCIDA POR *L. mesenteroides* B-1355
CON TRATAMIENTO TERMICO**

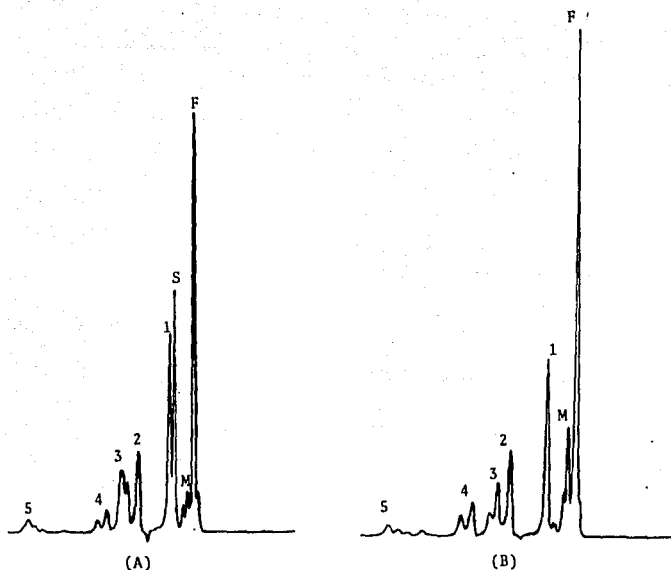
(A) productos de reacción; (B) tratamiento con dextranasa

NOTA: F=fructosa, S=sacarosa, M=maltosa, 1=panosa, 2=oligoaltaran (G3),
3=oligoaltaran (G4) y oligoaltaran (G5).

Es conocido que las glucosiltransferasas presentan actividad hidrolítica y de desproporcionación en ausencia de sustrato. López y Monsan en 1981, reportan que el producto G_3 es extremadamente sensible a esta propiedad enzimática: una alternansacarasa no purificada tiene altas velocidades de desproporcionación, hecho que se observa en los cromatogramas 16 y 17 en donde se aprecia que al tratar los productos con dextranasa los oligoalternanos que son resistentes a esta enzima también disminuyen. Esto se puede explicar porque al término de la reacción de síntesis determinado por la finalización de la sacarosa, no se desactivó la enzima, por lo que al estar presente durante el tratamiento con la dextranasa se presenta la actividad de desproporcionación. Uno de los productos que se ve más afectado el oligoalternan G_3 disminuyendo su concentración casi un 50% de la inicial.

Por otro lado, en la reacción de aceptor utilizando la alternansacarasa purificada BioEurope se puede observar claramente, que prácticamente no hay formación de oligodextranos y que los oligoalternanos al ser tratados con dextranasa prácticamente no se ven afectados.

En el cromatograma correspondiente a la enzima de la cepa B-512F, se observa la formación de oligodextranos típicos DP_4 y DP_5 sensibles al tratamiento con dextranasa.



**FIGURA 20. CROMATOGRAMA DE LOS PRODUCTOS DE REACCION DE ACEPTOR
DE LA ENZIMA ALTERNANSACARASA BIOEUROPE**

(A) productos de reacción; (B) tratamiento con dextranasa

NOTA: F=fructosa, S=sacarosa, M=maltosa, 1=panosa (DP3), 2=oligoaltermán (G3), 3=oligodextrán (DP4) y oligoaltermán (G4), 4=oligoaltermán (G5), 5=oligodextrán (DP5).

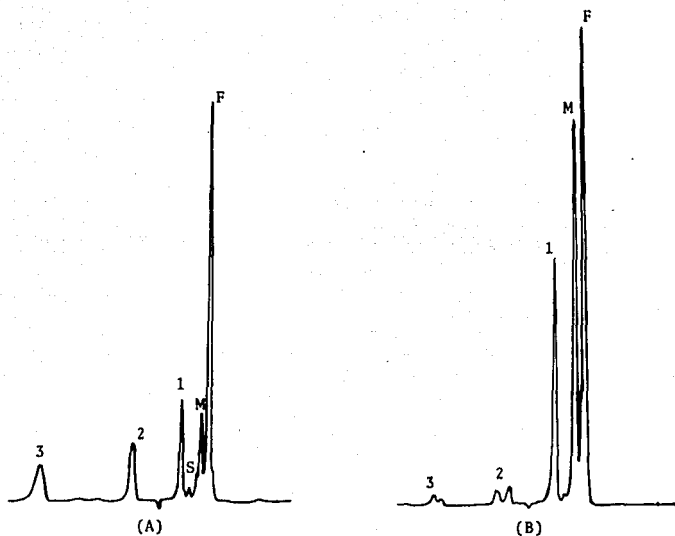


FIGURA 21. PRODUCTOS DE REACCION DE LA DEXTRANSACARASA PRODUCIDA

POR *L. mesenteroides* 512F

(A) productos de reacción; (B) tratamiento con dextranasa

NOTA: F=fructosa, S=sacarosa, M=maltosa, 1=panosa (DP3), 2=oligodextran (DP4), 3=oligodextran (DP5).

El estudio anterior sirvió para comparar los productos de reacción de acepto^r formados por la enzima producida por la cepa de *L.mesenteroides* B1355 con los formados por la enzima purificada alternansacarasa y los de la enzima de la cepa BS12F. De tal forma que se cuenta ahora con una metodología para la producción de toda una gama de oligosacáridos.

CONCLUSIONES

- El microorganismo aislado a partir de azúcar mascabado se identificó por su morfología y características bioquímicas como B. circulans.
- El microorganismo produce una enzima extracelular con actividad aparente de fructosiltransferasa asociada a una actividad invertasa.
- La actividad producida en el sobrenadante de fermentación se encuentra asociada al crecimiento microbiano y se ve afectada por el pH en el que crezca el microorganismo. Se encontró el valor óptimo a un pH de 7.
- La enzima es inducible en presencia de sacarosa y no con glucosa y lactosa como fuente de carbono.
- Los parámetros óptimos de actividad de la enzima en estudio son $T=40^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=7.0$ a una concentración de sacarosa del 10%.
- El polisacárido sintetizado, está formado por unidades de fructosa, de acuerdo con estudios de hidrólisis y HPLC del polímero sintetizado.
- La alternansacarasa producida por L. mesenteroides NRRL-B1355 después de ser purificada utilizando la propiedad que presenta de estabilidad al tratamiento térmico, sintetiza un polímero resistente a la degradación de la enzima hidrolítica dextranasa.

- En presencia de sacarosa y maltosa, la alternansacarasa sintetiza oligosacáridos de PM bajo que presentan tiempos de retención diferentes de los producidos por la enzima proveniente de la cepa L. mesenteroides NRRL-B512F, además de ser resistentes a la degradación por la dextranasa.

REFERENCIAS

- 1.- Alsop, R.M.(1983). Industrial production of dextrans; Progress in Industrial Microbiology. Vol.18. M.E. Bushel Elsevier Scientific Publishing Co. Amsterdam. p.1-40.
- 2.- Bailey, W.Robert. (1970). Diagnostic Microbiology. Ed. Panamericana. p.340-350.
- 3.- Berkeley, R.C.W; y col.(1984). Identification of *Bacillus* Species. Methods in Microbiology Vol. 16 p.291.
- 4.- Bergey D.H. (1986). Manual of sistematic Bacteriology. Vol.2 Williams and Wilkins Publishing. p.1105-1122.
- 6.- Cappuccino J.C., Sherman N.(1983). Microbiology a laboratory manual. Addison-Wesley publishing, New York. p. 123-124.
- 7.- Chaplin M.F. y Kennedy, J.F. (1988). Carbohydrate analysis a practical approach. IRL Press. Oxford. p.58.
- 8.- Cheethan, Peter S.J. (1988). Synthesis of novel disaccharides by a newly isolated fructosyl transferase from *Bacillus subtilis*. Enzyme Microb. Technol., 1989, Vol.11.
- 9.- Cot, G.L. y Robyt J. (1982). Acceptor reactions of alternansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355. Carbohydr. Res; 111, 127-142.
- 10.- Dixon, M., Webb, E. (1979). E. Enzymes. Academic Press. New York. Cap. 11-III. p.7-46.
- 11.- Fisher, A. (1897). The structure and Functions of Bacteria. The Clarendon Press. Oxford AT.
- 12.- Gerhardt, M. (1981). Manual of Methods for General bacteriology. American Society for Microbiology. Washington, D.C.

- 13.- Grove, W.B. (1884). A synopsis of the bacteria and yeast, Fungi and allied species. London. p. 17.
- 14.- Higgins, I.J., Bests, D. J., Jones, J. (1985). Biotechnology principles and applications. Blackweil Scientific publications. p.186-204.
- 15.- Honing, P.(1963). Principles of sugar technology. Elsevier Publishing Company. Amsterdam-London-New York. Vol.III.
- 16.- Jakoby, W. (1971). Enzyme purification and related techniques. Methods In Enzymology. Vol. XXII. Academic Press.
- 17.- Jeanes, A., Wilhom, C.A. and Miers, J.C. (1948). Preparation and characterization of dextran from L. mesenteroides; J. Biological Chem; Vol. 176 ; p. 603-614.
- 18.- Koepsell, H.J. and Tsuchiga, H. M. (1952). Enzymatic synthesis of dextran; J. of Biol. Chem; Vol. 200 . p.793-801.
- 19.- López Munguía C., Quintero, R. (1984). Tecnología enzimática. UNAM. México. p. 61-78.
- 20.- López-Munguía, C. A. (1985). Enzimas libres e inmovilizadas de aplicación Industrial. En Prospectiva de la Biotecnología en México. Comp. Rodolfo Quintero. Fundación Javier Barros Sierra, A. A; CONACYT.
- 21.- López-Munguía, C.A. and Monsan P. (1980). Dextran synthesis by inmovilized dextransucrase; Biochimie, Vol. 62 ; p. 323-329.
- 22.- López-Munguía, C.A (1979). Production, Purification et Immobilisation de la dextrane-saccharase de *Leuconostoc mesenteroides*. Tesis Doctoral. INSA Toulouse, Francia.
- 23.- López-Munguía A; F, Paul; P. Monsan; J. Biton, J.M. Michel y C. Lang. (1988). Enzymatic synthesis of oligoalternans. XIVth International Carbohydrate Symposium. August. Stocholm. p. 14-18.

- 24.- Mac Faddin, J.F. (1980). Biochemical tests for identification of medical bacteria. Williams and Wilkins. Baltmor/London.
- 25.- Martínez, E.J. (1985). Desarrollo de un proceso para la producción industrial de dextranas. Tesis. Facultad de Química UNAM.
- 26.- Meade, G. P. (1948). Cane sugar Handbook. J. Wiley, N.Y. p. 653-662.
- 27.- Monsan, P. y López-Mungula, C. A. (1981) On the production of dextran by free and immobilized dextransaccharase. Biotechnol. Bioeng. 23, 2027.
- 28.- Norris Richmond. (1981). Essays in Applied Microbiology. John Wiley and sons.
- 29.- Perlot, P. (1980). Production, purification et application de la levane-saccharasem de Bacillus subtilis. Tesis Doctoral. INSA Toulouse, Francia.
- 30.- Peterson, G.L. (1977). A simplification of the protein assay method of the Lowry et, al. wich is more generally applicable. Anal. Biochem. 83,p.346.
- 31.- Rhem, H.J., Reed, G. Biotechnology. Microbial Fundamentals. Vol.I VCH publishers. RFA Cap. 6.
- 32.- Sumner, James B., Howell Stacey, F. (1934). A method for determination of saccharase activity. J.Biol. Chem. Vol.108, p.51-54, 1935.
- 33.- The International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Microbial ecology of foods. (1980). Vol.II. Academic Press. p.778-803.
- 34.- Trejo, S. (1989). Caracterización e identificación de cepas de Hongos productores de dextranasa. Tesis. Facultad de ciencias. UNAM.
- 35.- Tsuchiya, et al. (1952). The effect of certain cultural factors on produccion of dextransaccharasa by *L. mesenteroides*. J. Bacterial. 64, p. 521-527.