



03072



14  
24

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**ESTUDIO CINÉTICO DE LAS REACCIONES DE ACEPTOR  
CATALIZADAS POR LA GLUCOSILTRANSFERASA DE  
*Leuconostoc mesenteroides* NRRL B1299.**

**Tesis de maestría en Biotecnología**

**Presenta:**

**Mónica Noel Sánchez González.**

**Cuernavaca, Mor.**

**1996.**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

JURADO ASIGNADO AL TEMA

Dr. Agustín López-Munguía Canales	Presidente
Dr. Rafael Vázquez Duhalt	Vocal
Dra. Carmen Beltrán Núñez	Secretario
Dra. Amelia Farrés González-Saravia	Suplente
Dr. Alejandro Alagón Cano	Suplente

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Bioingeniería del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. Agustín López-Munguía Canales.

Cuernavaca, 1996.

Los estudios de maestría fueron realizados gracias al apoyo económico otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), a través de la beca crédito 84189, así como por la beca de alimentación y hospedaje otorgada por el Instituto de Biotecnología.

## DEDICATORIAS

A mi padre Dr. Cuauhtémoc Sanchez Herrera, por su amor a la vida y coraje al enfrentarla.

A mi madre Sra. Maura González Meza, por su fortaleza, paciencia y amor.

A mi hermano Lic. Rubén F. Sánchez González, por su nobleza y amistad.

A la memoria de mi abuelita Profra. Ethelvina Herrera Cevallos.

A Dios, creo que esta etapa fue difícil en muchos aspectos, sin embargo nunca he estado sola.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Agustín López-Munguía Canales por permitirme participar en su grupo de trabajo, por su confianza e invaluable amistad.

A, Sonia y Jairo, Ma. Elena y Alfredo por todo su cariño, apoyo, orientación y preocupación.

A mis amigos: Fer, Rubén, Bety L., Lolis, Toño, Poncho, Nacho, Francisco S, Rocío y Jorge, Came, Marisol, Maricarmen, Mary T y Leo, Angeles, Ma. Piedad, Rosa I., Facundo, Eduardo T. y Marcela. Por su cariño y apoyo.

A todo el personal del laboratorio.

Al Técnico Laboratorista Fernando González Muñoz, por su asesoramiento y participación en el montaje de técnicas y utilización de equipo cromatográfico (HPLC).

A todos aquellos que de alguna manera participaron en mi formación académica.

## INDICE GENERAL

	Páginas
<b>Resumen</b>	I
<b>I. Introducción</b>	1
<b>II. Objetivo</b>	4
<b>III. Generalidades</b>	5
III.1 Dextranas	6
III.2 Estructura de las dextranas	7
III.3 Dextransacarasa de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> NRRL B1299.	10
III.4 Reacciones de aceptor	10
III.5 Mecanismo de reacción	15
III.6 Estructura de la enzima	22
III.7 Estudio cinético	25
III.8 Aplicaciones de los glucooligosacáridos	27
<b>IV. Materiales y métodos</b>	29
IV.1 Producción de la dextransacarasa	29
IV.1.1 Microorganismo	29
IV.1.2 Medio de cultivo	29
IV.1.3 Producción de inóculos	30
IV.1.4 Fermentación para la producción de la enzima	31
IV.2 Determinación de la actividad enzimática	31
IV.3 Cromatografía de líquidos de alta presión HPLC	32
IV.4 Rendimiento de oligosacáridos	32

IV.5 Consumo de sacarosa	33
IV.6 Síntesis de oligosacáridos	33
IV.7 Purificación de panosa	35
IV.8 Reacción con dextranasa y pululanasa	35
IV.9 Cromatografía en placa fina	36
Cinética de las reacciones de aceptor	36
<b>V. Resultados y discusión</b>	<b>38</b>
V.1 Producción de la dextranasa de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> NRRL B1299	38
V.2 Rendimiento y distribución de los productos de las reacciones de aceptor	40
V.2.1 Efecto de la concentración de reactivos	40
V.2.2 Relación de concentraciones sacarosa/maltosa (s/m)	41
V.2.3 Reacciones alimentadas	44
V.3 Purificación de panosa	47
V.3.1 Mezclas de reacción	47
V.3.2 Cromatografía por permeación en gel	48
V.4 Cinética de las reacciones de aceptor	49
V.4.1 Velocidad global de reacción	49
V.4.2 Cinéticas de producción de oligosacáridos	52
V.4.3 Cinéticas de producción de dextrana	53
V.5 Análisis de la síntesis de dextrana en las reacciones alimentadas	56
<b>VI Conclusiones</b>	<b>58</b>
<b>VII Bibliografía</b>	<b>60</b>

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Reacción de síntesis de dextana	5
Figura 2. Representación de diferentes estructuras de dextranas sintetizadas por dextransacararas pertenecientes a diversas cepas de <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	9
Figura 3. Panosa ( $\beta^2$ -O- $\alpha$ -glucopiranosilmaltosa)	12
Figura 4. Principales productos de las reacciones de aceptor sintetizados por dextransacararas de tres cepas de <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	13
Figura 5. Mecanismo propuesto por Robyt para explicar la síntesis de dextrana.	16
Figura 6. Modelo estructural del sitio activo de la dextransacarasa propuesto por Robyt.	18
Figura 7. Modelo estructural propuesto por Robyt para explicar las reacciones de aceptor.	18
Figura 8. Hipótesis propuesta por Kobayashi para explicar el mecanismo de la reacción de la dextransacarasa.	21
Figura 9. Esquema del mecanismo ping-pong Bi-Bi propuesto para la dextransacarasa.	26
Figura 10. Cinética de una fermentación alimentada con la cepa de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> NRRL B1299.	38
Figura 11. Efecto de la relación s/m sobre el rendimiento de panosa.	43
Figura 12. Evolución de la síntesis de panosa (DP3) y el DP4 en una reacción con relación s/m=0.05, utilizando a la enzima de la cepa de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> B1299.	44
Figura 13. Comparación de rendimientos de los productos de las reacciones en lote y alimentadas.	46
Figura 14. Purificación de panosa por medio de cromatografía por permeación en gel.	49
Figura 15. Efecto de la maltosa y la panosa en la velocidad inicial global de reacción catalizada por la dextransacarasa de	

*Leuconostoc mesenteroides* NRRL B1299. 51

Figura 16. Efecto de la maltosa y la panosa en la velocidad inicial de reacción de síntesis de oligosacáridos. 53

Figura 17. Efecto de la panosa y la maltosa en la velocidad inicial de reacción de síntesis de dextrana. 54

## INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Composición de medio de cultivo para <i>Leuconostoc mesenteroides</i> NRRL B1299.	30
Tabla 2. Concentración de reactivos involucrados en la determinación del efecto de la relación s/m sobre el rendimiento de oligosacáridos.	34
Tabla 3. Balance de la producción de la enzima glucosiltransferasa por fermentación alimentada de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> NRRL B1299.	39
Tabla 4. Efecto de la concentración de reactivos sobre el rendimiento y producción de oligosacáridos y dextrana.	41
Tabla 5. Utilización de diferentes relaciones s/m.	42
Tabla 6. Hidrólisis de productos de reacciones de aceptor con alto contenido de panosa empleando pululanasa y dextranasa.	48

## INDICE DE ABREVIATURAS

<b>D.P.</b>	Número de unidades de glucosa contenidas en una molécula (degree of polymerization).
<b>dex.</b>	Dextrana
<b>E</b>	Enzima
<b>GTF-I</b>	Glucosiltransferasa que sintetiza polímero insoluble
<b>GTF-S</b>	Glucosiltransferasa que sintetiza polímero soluble
<b>L.m.</b>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<b>olig.</b>	Oligosacárido
<b>s/a</b>	Relación de concentraciones sacarosa/acceptor
<b>s/m</b>	Relación de concentraciones sacarosa/maltosa
<b>sac.</b>	Sacarosa
<b>sp.</b>	Especie inespecífica
<b>U.I.</b>	Unidades Internacionales
<b>UDR</b>	Unidades de repetición
<b>X</b>	Consumo
<b>y</b>	Rendimiento

## RESUMEN

Las dextransacarasas son enzimas con la capacidad de transferir un grupo  $\alpha$ -D-glucopiranosilo de la sacarosa a una cadena de glucosa, dando lugar a la formación de polisacáridos (dextrans). La presencia de azúcares de bajo peso molecular (aceptores) en la mezcla de reacción evita el crecimiento de las cadenas de polímero, dirigiendo la síntesis hacia la producción de oligosacáridos.

Debido a la importancia biológica de los oligosacáridos en los campos de la agroquímica, alimentos, cosmetología y en las áreas de la salud, es de gran interés el conocimiento de la cinética de la reacción de síntesis, así como el efecto de diversos parámetros en el proceso, con el fin de obtener altos rendimientos y una adecuada selectividad de productos.

En el presente trabajo se determinó el efecto que ejerce la concentración de azúcares así como la relación de concentraciones sacarosa/maltosa sobre el rendimiento y distribución de los productos de aceptor y sobre el rendimiento de dextrana.

Por otra parte, se analizó el efecto que ejercen la maltosa y la panosa (primer azúcar sintetizado cuando la maltosa es aceptor), sobre la cinética de síntesis de oligosacáridos y de dextrana.

## **I. INTRODUCCIÓN**

Los carbohidratos constituyen la clase de compuestos más abundantes en la naturaleza. Anteriormente eran considerados biológica y fisiológicamente menos importantes comparados con los ácidos nucleicos, proteínas y lípidos. Solían ser vistos como fuente de carbono y de energía, así como material estructural para las células. En las últimas décadas, los carbohidratos y oligosacáridos han adquirido una relevancia biológica creciente debido al descubrimiento de las glicoproteínas y los glicolípidos. Los oligosacáridos representan una parte de las proteínas unidas a la membrana celular y constituyen los sitios de reconocimiento para hormonas, anticuerpos, toxinas, virus y bacterias. Son la base molecular de los grupos sanguíneos, son clave en el reconocimiento, crecimiento y diferenciación celular, entre otras funciones.

La gran complejidad estructural de los oligosacáridos es la base de la alta especificidad de sus interacciones y al mismo tiempo dificulta la posibilidad de desarrollar métodos eficientes para su síntesis por vía química.

Las múltiples aplicaciones de los oligosacáridos en diversos campos (agroquímica, cosméticos y alimentos), pero particularmente en el área de la salud (inmunoestimulación, fenómenos inflamatorios, etc.), hace sumamente atractiva la búsqueda de procesos de síntesis eficientes y viables.

Tradicionalmente los oligosacáridos se han obtenido mediante extracción de plantas o de la hidrólisis enzimática de polímeros de origen microbiano o vegetal. En general, este tipo de procesos resulta poco eficiente y presenta dificultades para ser llevado a grande escala.

La Biotecnología constituye una alternativa para la síntesis de oligosacáridos y polisacáridos, ya sea por vía fermentativa o por medio de una bioconversión enzimática.

En lo que a procesos enzimáticos se refiere, actualmente existen dos grandes alternativas: el uso de hidrolasas y glicosiltransferasas. Progresos recientes en la enzimología han demostrado el uso potencial de las hidrolasas en las reacciones de hidrólisis inversa para la síntesis de glucooligosacáridos y galactooligosacáridos. Sin embargo, los bajos rendimientos obtenidos siguen siendo una de las principales limitantes en la aplicación de esta enzima. Otra opción para la síntesis de oligosacáridos consiste en el uso de transferasas. En la industria son actualmente usadas en la producción de fructooligosacáridos y ciclodextrinas.

En particular, los glucooligosacáridos pueden ser sintetizados a través de cierto tipo de glicosiltransferasas como son las dextransacarasas (E.C.2.4.1.5). Estas enzimas catalizan la transferencia de glucosa proveniente de la sacarosa a moléculas aceptoras, principalmente azúcares, para la síntesis de glucooligosacáridos (Koepsell 1953). En ausencia de aceptores el principal producto de la reacción es la dextrana, un polímero compuesto por enlaces  $\alpha(1-6)$  en la cadena principal y con ramificaciones en  $\alpha(1-2)$ ,  $\alpha(1-3)$  y  $\alpha(1-4)$ . La estructura química de las dextranas es altamente dependiente de la cepa productora de la glicosiltransferasa. Las principales bacterias que sintetizan dextranas pertenecen a la familia de lactobacilos particularmente a los géneros *Leuconostoc*, *Streptococcus* y *Lactobacillus*. La dextrana más estudiada es la sintetizada por la glicosiltransferasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512 que contiene 95% de enlaces  $\alpha(1-6)$  y 5% de enlaces  $\alpha(1-3)$  (Alsop

1983). El polímero producido por la glucosiltransferasa de la cepa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B1299 tiene un alto porcentaje de ramificaciones en  $\alpha(1-2)$  y en menor proporción de  $\alpha(1-3)$  (Kobayashi 1973 a y b). En presencia de maltosa como aceptor cataliza la síntesis de glucooligosacáridos que contienen proporciones variables de enlaces  $\alpha(1-2)$  producto de la transferencia de glucosa a la maltosa (Castillo et al.1992, Remaud-Simeon et al.1994). Se ha demostrado que este tipo de oligosacáridos no son atacados por enzimas digestivas y son preferentemente consumidos por bacterias benéficas del colon (Valette 1993). La ingestión de oligosacáridos incrementa la población de bifidobacterias nativas del colon las cuales ejercen un efecto supresor sobre la actividad de las bacterias putrefactivas y reduce la formación de productos de fermentación tóxicos. La ingestión de lactobacilos muestra los mismos efectos, sin embargo la incorporación de bifidobacterias en los alimentos procesados es difícil pues las bacterias son susceptibles al calor, ácidos, oxígeno y esfuerzos cortantes (Tomamatsu 1994).

El presente trabajo se ubica en el contexto de un proyecto de colaboración entre el Instituto de Biotecnología y la compañía Bioeuropa, financiado por la Unión Europea y cuyo objetivo es la obtención de oligosacáridos de uso alimentario. En particular esta investigación está orientada al estudio de los parámetros que influyen sobre el tipo de producto y la cinética de las reacciones de producción de oligosacáridos a través de la glucosiltransferasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B1299.

## II. OBJETIVOS

Determinar los parámetros que influyen sobre el tipo de producto y la cinética de las reacciones de producción de oligosacáridos.

Los objetivos particulares son:

1. Determinar el efecto de la concentración de sacarosa, maltosa y el cociente de la relación sacarosa/maltosa, sobre el rendimiento y distribución de los productos de aceptor, así como sobre el rendimiento de dextrana.
2. Analizar el efecto que ejerce la concentración de maltosa sobre la cinética de síntesis de panosa y de dextrana.
3. Estudiar el efecto que ejerce la panosa sobre la cinética de síntesis de oligosacáridos y de dextrana.

### III. GENERALIDADES

Las transferasas son enzimas que catalizan el traslado de un grupo funcional específico desde un sustrato (donador) a otro (aceptor). La energía necesaria para la reacción es provista por el enlace original y es almacenada en un intermediario covalente enzima sustrato (Dedonder 1972, Monsan 1995).

Las glucosiltransferasas catalizan la conversión de sacarosa en glucanos de alto grado de polimerización, pero en presencia de carbohidratos de bajo peso molecular, las moléculas de glucosa son transferidas a estos azúcares para formar oligosacáridos. Por esta razón, el interés actual en el estudio de estas enzimas radica en su aplicación a la síntesis de neoazúcares y oligosacáridos (Monsan 1995).

Las dextranasacarasa (sacarosa:1,6- $\alpha$ -D-glucan 6- $\alpha$ -D-glucosiltransferasa EC 2.4.1.5) son glucosiltransferasas elaboradas por microorganismos de la familia *Lactobacillaceae* géneros *Leuconostoc* (especies *mesenteroides* y *dextranicum*) y *Streptococcus* (Robyt 1979). Estas enzimas catalizan la síntesis de dextranas a partir de sacarosa de acuerdo a la siguiente reacción:

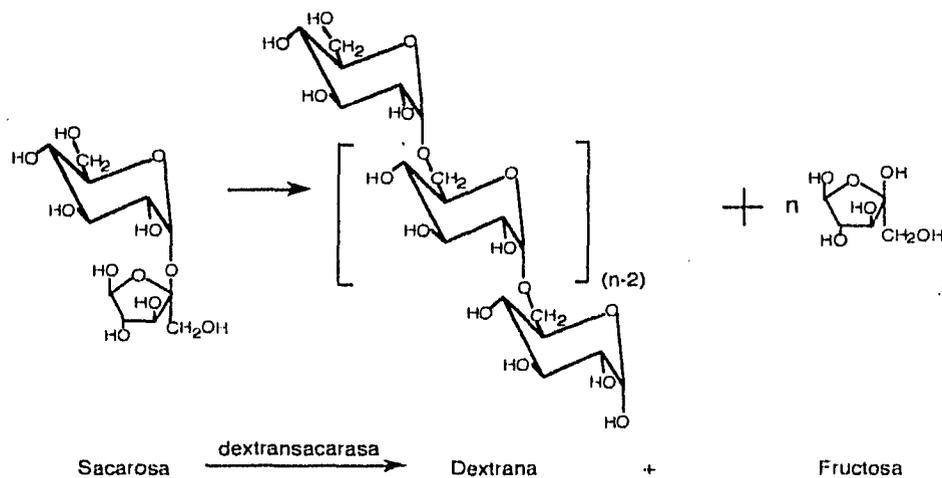


Figura 1. Reacción de síntesis de dextrana.

### III. 1 Dextranas

Dextranas es el nombre otorgado a un grupo de polisacáridos bacterianos extracelulares compuestos casi exclusivamente por unidades monoméricas de  $\alpha$ -D-glucopiranosas unidas principalmente por enlaces  $\alpha(1-6)$  (Alsop 1983).

Los estudios acerca de las dextranas fueron iniciados por Pasteur en el siglo pasado, debido a que estos polímeros se encontraban como contaminantes en jugos y alimentos que contienen sacarosa. Más tarde en 1874 Scheibler determinó que estos polisacáridos tenían rotación óptica positiva y fórmula mínima de  $C_6H_{10}O_5$ . Van Tieghem en 1861 aisló e identificó a las bacterias como *Leuconostoc mesenteroides*. (Alsop 1983, Robyt 1991)

A pesar de que las dextranas representan un problema grave en la industria refinadora de azúcar donde al producirse ocasionan el bloqueo de tuberías y filtros, inhiben la cristalización, reducen el rendimiento y distorsionan las mediciones de rotación óptica utilizadas para la determinación de la pureza de la sacarosa, durante la segunda guerra mundial se inició su producción industrial, ya que se desarrollaron aplicaciones basadas en su inocuidad y a su comportamiento reológico, en particular como sustituto de plasma sanguíneo. Sin embargo, son pocas las aplicaciones comerciales de la dextrana debido a que su precio es más alto que el de la celulosa o el almidón y sus propiedades reológicas menos interesantes que las de xantanas o alginatos. Por esta razón, las dextranas sólo son usadas en productos de alta calidad (Sephadex<sup>®</sup>, preparaciones dextrana hemoglobina, dextrana sulfato, etc.) o alta tecnología (dextrana acoplada a sustancias biológicamente activas) (Belder 1990).

### III. 2. Estructura de las dextranas.

La estructura aproximada de las dextranas fue determinada a través de sus propiedades químicas (oxidación por periodato) y físicas (solubilidad). Se encontró que tienen una relación relativamente alta de enlaces  $\alpha(1-6)$  con cantidades variables de  $\alpha(1-2)$ ,  $\alpha(1-3)$  y  $\alpha(1-4)$  dependiendo de la cepa productora de la enzima. La posición de las ramificaciones se identificó a través de un análisis por metilación.

De acuerdo a sus características estructurales, las dextranas pueden ser divididas en tres grupos:

**Clase 1**, dextranas que contienen en la cadena principal enlaces  $\alpha(1-6)$  con ramificaciones en las posiciones 2, 3 y 4.

**Clase 2**, dextranas que contienen en la cadena principal enlaces  $\alpha(1-6)$  y  $\alpha(1-3)$  en forma alternada con ramificaciones en la posición 3.

**Clase 3**, dextranas que contienen en la cadena principal enlaces  $\alpha(1-3)$  en forma consecutiva y ramificaciones con enlaces  $\alpha(1-6)$ .

A la clase 1 pertenecen la mayoría de las dextranas. De acuerdo a los análisis por fraccionación diferencial con etanol se observó que algunas cepas producían polisacáridos insolubles y algunas otras forman más de un tipo de polisacárido. Se les denominó L a la fracción menos soluble y S a la fracción más soluble dependiendo de la concentración de alcohol a la cual precipitan, generalmente 36-37% y 40-44% respectivamente.

La cepa B512 de *Leuconostoc mesenteroides* ha sido la más estudiada, dado que el polímero que produce tiene la forma clásica de las dextranas (clase 1), un alto porcentaje de enlaces  $\alpha(1-6)$  consecutivos y relativamente un bajo porcentaje de ramificaciones con enlaces  $\alpha(1-3)$ . La fracción L de la dextrana

producida por la cepa de *Leuconostoc mesenteroides* B1355 tiene una estructura idéntica la dextrana de la cepa B512. La fracción L del polisacárido producido por la cepa B742 tiene una estructura relacionada con la estructura del polímero producido por la cepa B512, contiene 87% de enlaces  $\alpha(1-6)$  pero sólo un 13% de enlaces  $\alpha(1-4)$ .

Sólo tres ejemplos de dextranas clase 2 son conocidos: la fracción S de las cepas de *Leuconostoc mesenteroides* B1355, B1498 y B1501, las cuales tienen 50% de enlaces  $\alpha(1-6)$  y 50% de enlaces  $\alpha(1-3)$ . Estos glucanos no son verdaderas dextranas debido a que no tienen enlaces  $\alpha(1-6)$  en forma consecutiva. Tienen propiedades físicas y químicas diferentes a las dextranas de la clase 1 por lo que son llamadas alternanas en lugar de dextranas.

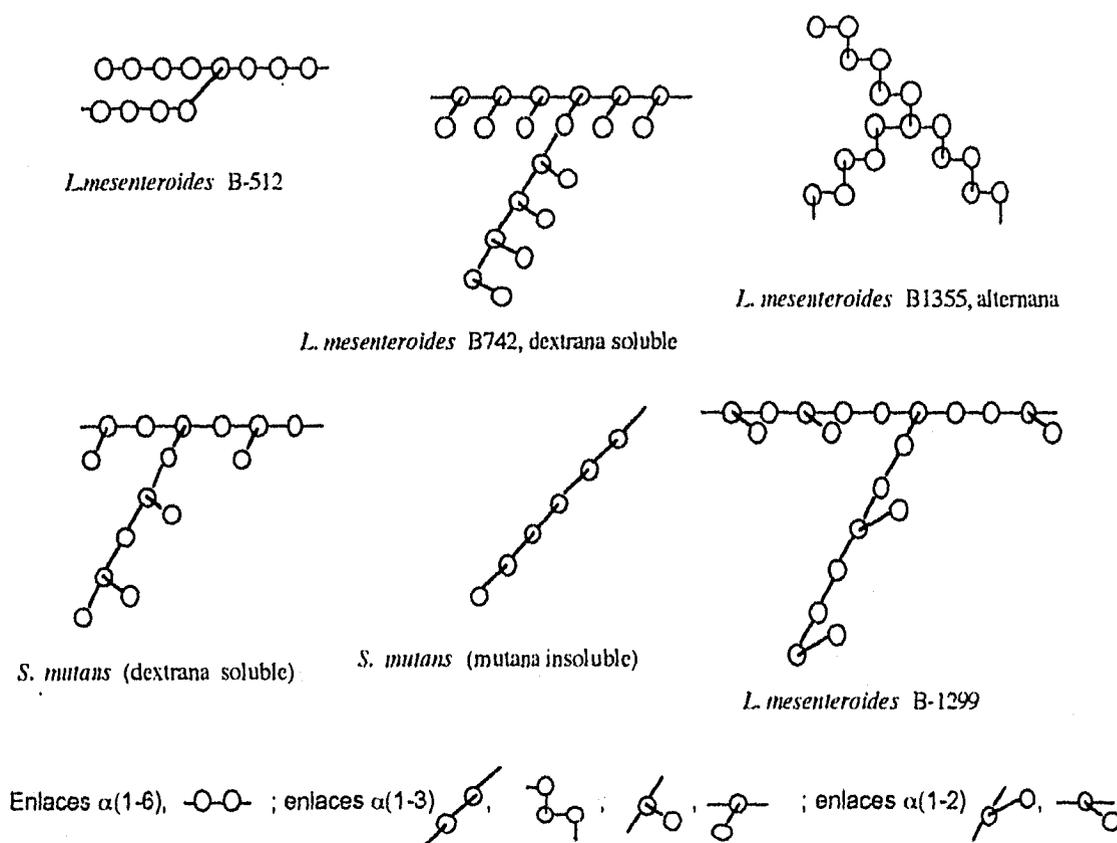
La fracción S de la dextrana producida por la cepa B742 contiene material similar a las alternanas, debido a que presenta 50% de enlaces  $\alpha(1-6)$  y 50% de enlaces  $\alpha(1-3)$ , pero contrariamente a éstas, los enlaces  $\alpha(1-3)$  están en forma de ramificaciones. Esta dextrana posee el mayor grado de ramificación y exhibe una estructura parecida a un peine, la cual es completamente resistente al ataque por endodextranasas. (Alsop 1983, Robyt 1986).

La estructura química de la dextrana de la cepa B1299 ha sido extensamente estudiada. La enzima de este microorganismo produce dos tipos de polímero L y S los cuales tienen enlaces  $\alpha(1-6)$ ,  $\alpha(1-2)$  y  $\alpha(1-3)$ . Los enlaces  $\alpha(1-6)$  se encuentran en la cadena principal, los  $\alpha(1-2)$  en los puntos de ramificación, mientras que los enlaces  $\alpha(1-3)$  se encuentran en porciones lineales, específicamente en los extremos no reductores del polímero (Bourne et al. 1972; Kobayashi et al 1973a; Bourne et al. 1974; Seymour et al. 1979a).

La diferencia que existe entre los polímeros L y S es en el número de enlaces  $\alpha(1-3)$ , el primero presenta un mayor número de éstos en las porciones terminales (Bourne et al 1972; Kobayashi et al 1973b; Seymour et al 1979 a y b).

Desde 1976 los estudios para dilucidar la estructura de las dextranas se basan en el análisis por metilación, oxidación por periodato y  $^{13}\text{C}$ -RMN. (Alsop 1983)

En la figura 2 se presenta un esquema de la estructura de algunos polímeros.



**Figura 2** Representación de diferentes estructuras de dextranas sintetizadas por dextranacararas pertenecientes a diversas cepas de *Leuconostoc mesenteroides*.

### III.3 Dextransacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B1299.

La actividad de dextransacarasa de la cepa de *Leuconostoc mesenteroides* B1299 ha sido detectada asociada a células o como sobrenadante en una proporción 3:2 en términos de actividad total (Kobayashi y Matsuda 1974).

Se ha demostrado la presencia de isoenzimas para estas dos actividades a través de análisis cromatográficos en DEAE-celulosa y electroforesis en geles de poliacrilamida (Kobayashi y Matsuda 1974, 1975a).

Por lo que respecta a las isoenzimas extracelulares, difieren unas de otras en diversas propiedades tales como pH óptimo, constantes de Michaelis-Menten y peso molecular. La isoenzima I, que es la forma monomérica tiene un peso molecular de 42,000. La isoenzima II (dímero) tiene un peso molecular de 83,000 y la forma polimérica también denominada N, tiene pesos moleculares de 127 000, 169 000, 212 000 y hasta más de 450 000 (Kobayashi y Matsuda 1976).

Se encontraron dos isoenzimas asociadas a células, las cuales difieren en el pH y temperatura óptimos así como en la carga neta, sin embargo, presentan pesos moleculares semejantes: 69 000 para la isoenzima I y 79 000 para la isoenzima II (Kobayashi y Matsuda 1974, 1975b). La isoenzima II asociada al paquete celular, sintetiza el polímero característico de la cepa B1299 (Kobayashi y Matsuda 1977).

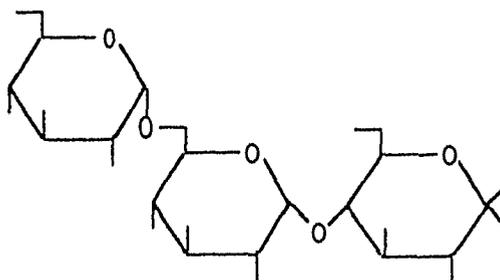
### III.4 Reacciones de aceptor.

Koepsell en 1953 observó que cuando se introducían algunos azúcares en la mezcla de reacción de la dextransacarasa, se iniciaba la síntesis de

oligosacáridos a expensas de la síntesis de dextrana. Los residuos glucosilo de la sacarosa son transferidos por la dextransacarasa a un grupo hidroxilo libre de estos azúcares denominados aceptores (Paul et al. 1986). Los aceptores pueden ser desde monosacáridos hasta polisacáridos. Existen algunos casos en los que los productos de la reacción funcionan a su vez como aceptores produciendo de esta manera series homólogas; en otros, el primer producto de la reacción no es un buen aceptor y por lo tanto se detiene la síntesis de oligosacáridos. Un ejemplo lo constituye la reacción con fructosa, subproducto de la reacción, ya que sólo se produce un disacárido conocido como leucrosa (5-O- $\alpha$ -Dglucopiranosil-D-fructopiranososa) en bajas concentraciones (Koepsell et al. 1953, Stodola et al. 1956, Robyt y Walseth 1978). Muchos carbohidratos pueden actuar como aceptores, habiéndose reconocido hasta la fecha un total de 30 incluyendo a la dextrana (para la ramificación de los polímeros) (Robyt y Taniguchi 1976, 1983, Ebert y Shenk 1968). Varios autores han clasificado a las moléculasceptoras de acuerdo a su capacidad para desviar la síntesis de polímero hacia la producción de oligosacáridos y al efecto que ejercen sobre la velocidad de reacción, de tal manera que existen aceptores fuertes, intermedios y débiles (Ebert y Shenk 1968). Además de la naturaleza de los aceptores, la concentración de los mismos está involucrada en el número de moléculas desviadas hacia la síntesis de oligosacáridos. Lo anterior se observa a través del efecto que tiene en el rendimiento la relación de concentraciones sacarosa/aceptor (s/a). Un medio con una alta concentración de aceptor relativa a la sacarosa (relación s/a muy pequeña), se espera que produzca poca dextrana y una mayor proporción de oligosacáridos (Robyt y Eklund 1983, Tanniseven y Robyt 1993).

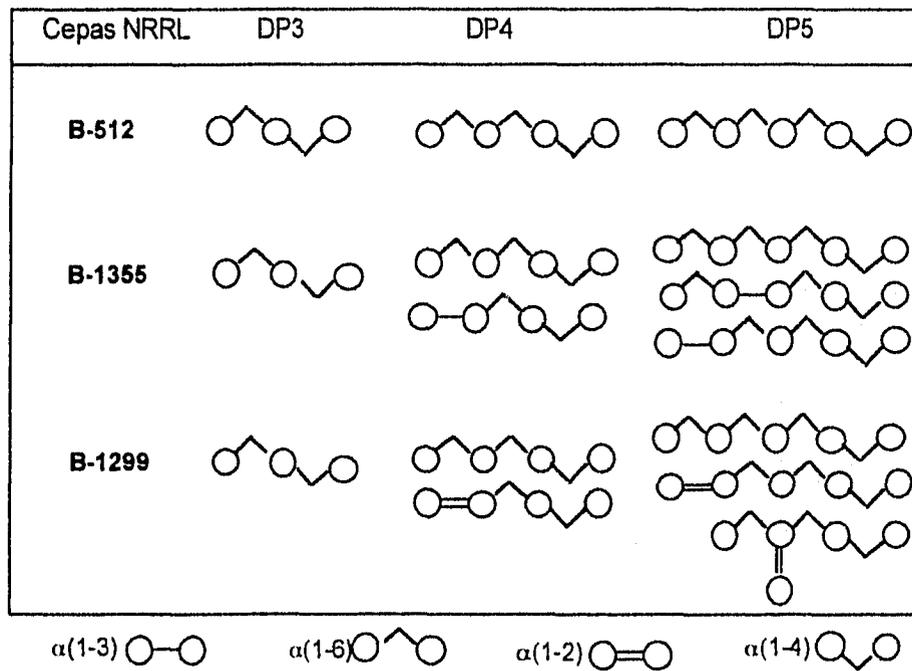
Entre los aceptores, se ha demostrado que la maltosa y la isomaltosa son los más eficientes (Robyt y Eklund 1983), por lo que la maltosa ha sido ampliamente utilizada en la síntesis de oligosacáridos a través de la dextransacarasa.

La estructura química de los productos de aceptor, al igual que las dextranas, depende de la cepa productora de la dextransacarasa. La glucosiltransferasa de la cepa de *Leuconostoc mesenteroides* B512 en presencia de maltosa produce inicialmente un trisacárido conocido como panosa (6<sup>2</sup>-O- $\alpha$ -D-glucopiranosil maltosa), cuya estructura se muestra en la figura 3. Cuando este azúcar funciona a su vez como aceptor, se produce un tetrasacárido (6<sup>2</sup>-O-isomaltosilmaltosa), que nuevamente funciona como aceptor para producir un pentasacárido (6<sup>2</sup>-O-isomaltotriosilmaltosa) y así sucesivamente. De esta manera se produce una serie homóloga de productos de aceptor que son isomaltodextrinas unidas al oxígeno del carbono número seis del extremo no reductor de la maltosa. Los productos oligosacáridos son designados DP3, DP4, DP5, etc., indicando de este modo el grado de polimerización (degree of polymerization) 3, 4, 5... (Robyt y Eklund 1983).



**Figura 3.** Panosa (6<sup>2</sup>-O- $\alpha$ -glucopiranosilmaltosa)

Castillo et al. (1992), analizaron varias cepas de *Leuconostoc mesenteroides* en relación con su capacidad de producción de oligosacáridos. De ellas, sólo las cepas B1355 y B1299, produjeron oligosacáridos en grandes cantidades, con propiedades estructurales diferentes a los de la cepa B512 (figura 4). Los productos de la cepa B1299 han sido identificados como glucooligosacáridos con enlaces  $\alpha(1-2)$  (Paul et al. 1988).



**Figura 4.** Principales productos de las reacciones de aceptor sintetizados por dextranacararasas de tres cepas de *Leuconostoc mesenteroides* (Castillo et al. 1992).

El mecanismo de polimerización en presencia de aceptores, puede ser directamente utilizado para producir dextranas de peso molecular controlado. Paul et al. (1986) y Oriol et al. (1987), demostraron lo anterior en dos etapas de síntesis. En la primera etapa se emplea sacarosa y maltosa en una relación alta y en la segunda, los productos de la primera reacción son empleados como aceptores. El índice de dispersión presentado por estas dextranas es similar al de las comercialmente disponibles, preparadas por la hidrólisis ácida de polímeros de alto peso molecular. El índice de dispersión (polydispersity), es definido como la distribución de pesos moleculares en una mezcla de reacción. Dentro de las condiciones de reacción estudiadas para esta síntesis, la que ejerce mayor influencia sobre el peso molecular de las dextranas resultantes fue la relación de concentraciones sacarosa/aceptor (s/a). Lo anterior fue corroborado en las dos etapas mencionadas anteriormente.

El peso molecular de los productos de aceptor se puede regular a tal extremo que en una reacción en la que se utiliza maltosa como aceptor, con relación de concentraciones  $s/m=0.05$ , es posible obtener panosa como único producto de reacción (Dongling y Robyt 1993). Los estudios anteriormente mencionados, fueron realizados utilizando a la glucosiltransferasa de la cepa de *Leuconostoc mesenteroides* B512.

### III.5 Mecanismo de reacción.

El mecanismo de reacción de la dextransacarasa es hasta la fecha sujeto de polémica.

El mecanismo propuesto por Robyt en 1974 (figura 5), es el más difundido ya que explica diversos fenómenos que ocurren en la reacción con la dextransacarasa. Dicho mecanismo supone la existencia de dos nucleófilos en el sitio activo ( $X_1$  y  $X_2$ ), que más tarde se comprobó, correspondían a grupos carboxilo del aspártico (Mooser et al. 1991). Estos grupos atacan a la sacarosa para producir un complejo con dos grupos glucosilo covalentemente unidos a los nucleófilos a través del  $C_1$ . En pasos subsecuentes, el oxígeno del  $C_6$ -OH de una de las moléculas de glucosa del complejo realiza un ataque nucleofílico al  $C_1$  de la glucosa vecina para formar un enlace  $\alpha(1-6)$ . Esto ocasiona la liberación de uno de los dos nucleófilos, lo que le permite atacar a una nueva molécula de sacarosa, para restaurar así el complejo entre la enzima y glucosa. El grupo  $C_6$ -OH de la nueva glucosa incorporada, ataca al  $C_1$  del grupo isomaltosil, formando un enlace  $\alpha(1-6)$  adicional y dando lugar a un trisacárido.

Durante la síntesis, los dos grupos catalíticos forman alternativamente complejos covalentes con la glucosa y con la dextrana. La cadena de dextrana crece por la aparente inserción de glucosa entre el grupo catalítico y el extremo reductor del polisacárido. Con este modelo se elimina la necesidad de un "iniciador" (figura 5).

El proceso de crecimiento continúa hasta que la concentración de fructosa alcanza niveles tales que se hace posible la transferencia de cadenas de

### III.5 Mecanismo de reacción.

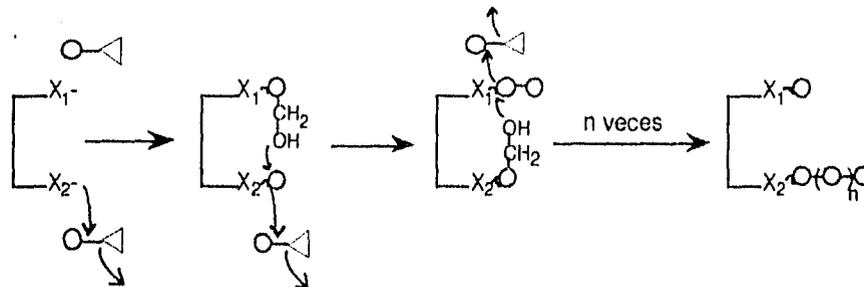
El mecanismo de reacción de la dextransacarasa es hasta la fecha sujeto de polémica.

El mecanismo propuesto por Robyt en 1974 (figura 5), es el más difundido ya que explica diversos fenómenos que ocurren en la reacción con la dextransacarasa. Dicho mecanismo supone la existencia de dos nucleófilos en el sitio activo ( $X_1$  y  $X_2$ ), que más tarde se comprobó, correspondían a grupos carboxilo del aspártico (Mooser et al. 1991). Estos grupos atacan a la sacarosa para producir un complejo con dos grupos glucosilo covalentemente unidos a los nucleófilos a través del  $C_1$ . En pasos subsecuentes, el oxígeno del  $C_6$ -OH de una de las moléculas de glucosa del complejo realiza un ataque nucleofílico al  $C_1$  de la glucosa vecina para formar un enlace  $\alpha(1-6)$ . Esto ocasiona la liberación de uno de los dos nucleófilos, lo que le permite atacar a una nueva molécula de sacarosa, para restaurar así el complejo entre la enzima y glucosa. El grupo  $C_6$ -OH de la nueva glucosa incorporada, ataca al  $C_1$  del grupo isomaltosil, formando un enlace  $\alpha(1-6)$  adicional y dando lugar a un trisacárido.

Durante la síntesis, los dos grupos catalíticos forman alternativamente complejos covalentes con la glucosa y con la dextrana. La cadena de dextrana crece por la aparente inserción de glucosa entre el grupo catalítico y el extremo reductor del polisacárido. Con este modelo se elimina la necesidad de un "iniciador" (figura 5).

El proceso de crecimiento continúa hasta que la concentración de fructosa alcanza niveles tales que se hace posible la transferencia de cadenas de

dextrana y/o la unidad glucosilo unida al sitio activo, deteniendo el crecimiento del polisacárido o formando leucrosa, respectivamente.



$X_1$  y  $X_2$ , representan nucleófilos del sitio activo;  $\bigcirc-\triangle$  representa sacarosa;  $\bigcirc$  es un grupo glucosilo;  $\triangle$  es un grupo fructosilo y  $-$  representa un enlace  $\alpha(1-6)$

**Figura 5.** Mecanismo propuesto por Robyt para explicar la síntesis de dextrana.

Robyt et al. (1978) propusieron también un mecanismo para explicar las reacciones de aceptor. Se postula que un grupo hidroxilo del aceptor actúa como nucleófilo y desplaza tanto al grupo glucosilo como al grupo dextranosilo del sitio activo, formando con ellos un enlace  $\alpha(1-6)$ . Cuando la concentración del primer producto de la reacción alcanza un valor suficientemente alto, actúa como aceptor dando lugar a la formación de una serie homóloga.

Además de dilucidar el mecanismo de formación de dextrana, propuso un modelo estructural para explicar los fenómenos observados con la dextransacarasa. Su modelo contempla la presencia de dos sitios de unión a sacarosa y otro de unión para aceptores (según se muestra en la figura 6) (Tanriseven y Robyt, 1992). Esta conclusión la deriva de observar que aceptores eficientes no inhiben competitivamente la unión de la sacarosa. De esta manera postuló la existencia de un sitio de unión para los aceptores,

separado del sitio de unión a sacarosa. Se desconoce el número de sitios de unión a aceptores, pero puede haber más de uno.

De acuerdo con Robyt (Tanriseven y Robyt 1992), el sitio de unión a aceptores se encuentra entre los dos nucleófilos del sitio activo, de tal manera que la unión de un aceptor bloquea la inserción de una molécula de glucosa en la dextrana inhibiendo la síntesis del polisacárido y desviando las unidades de glucosa hacia la síntesis de productos de aceptor (figura 7). Los aceptores pueden también reaccionar con los grupos dextranosilo unidos al sitio activo deteniendo así la síntesis de polisacárido. Para explicar que la maltosa es el mejor aceptor, propone que en el sitio de unión a aceptores hay por los menos 2 subsitios para la unión de glucosas.

En el caso de las reacciones de ramificación, la dextrana actúa como aceptor desplazando unidades de glucosa para formar una ramificación o bien, puede desplazar a un grupo dextranosilo para formar una ramificación más grande, por lo que no se requiere de un sitio adicional para la formación de ramificaciones.

Se ha propuesto igualmente la existencia de un tercer sitio de unión a sacarosa de baja afinidad para explicar la inhibición por exceso de sustrato (Tanriseven y Robyt, 1993), de tal manera que al haber un excedente de sacarosa este sitio es ocupado, ocasionando un cambio en la conformación de la enzima (figura 6 y 7). Este cambio no afecta la unión de moléculas de sacarosa, ni la formación del complejo glucosil-enzima, ni disminuye la afinidad por los aceptores, sólo evita la interacción de los dos grupos glucosilo para la síntesis de dextrana. Esta es la conclusión derivada de experimentos realizados en reacciones sin aceptor con altas concentraciones de sacarosa, según se observa por

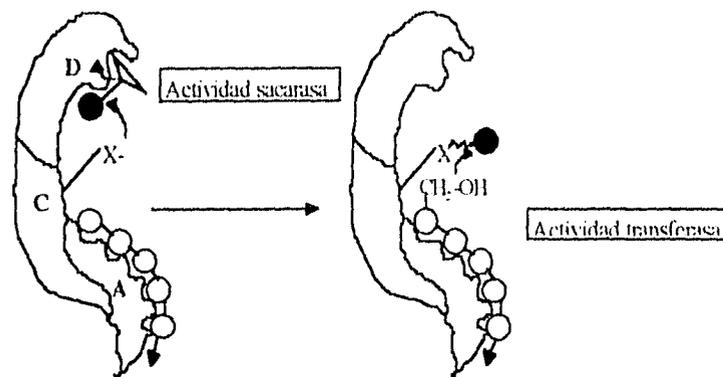


cromatografía en placa fina, se producen glucosa y fructosa libres. Si a estas preparaciones se les agrega un aceptor potente como la maltosa, la síntesis se desvía casi completamente hacia la producción de oligosacáridos, siendo mínima la cantidad de dextrana sintetizada aún empleando relaciones  $s/a=1$ . El modelo estructural y funcional total se presenta en las figuras 6 y 7. Es conveniente señalar que todos los estudios realizados por Robyt se refirieron a la dextranasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512.

Kobayashi y Matsuda (1986) a partir de un estudio cinético de la dextranasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B1416, proponen un mecanismo alternativo de reacción. Dicho mecanismo no tiene como objeto la descripción de todos los fenómenos observados en la reacción de la dextranasa, pues considera que sólo se podrá obtener un modelo válido y completo cuando se conozca la secuencia de aminoácidos del sitio catalítico. La hipótesis propuesta por este autor se esquematiza en la figura 8 y en ella se contempla que el donador (sacarosa) y el sustrato aceptor (dextrana), se unen a sitios distintos de la enzima. Varios resultados son congruentes con este modelo. Se demostró que el tipo de inhibición de diversos compuestos era diferente para cada sustrato (sacarosa y dextrana). Por ejemplo, D-fructosa, maltosa y metil- $\alpha$ -D-glucósido, inhiben competitivamente la unión de la sacarosa al sitio activo, mientras que inhiben de manera no competitiva y mixta la unión de la dextrana. Se agrupó la acción de 16 efectores en seis categorías dependiendo si activaban o inhibían la actividad de sacarasa o transferasa de la enzima. La actividad de sacarasa representa la reacción entre el donador sacarosa y el grupo catalítico y la actividad de transferasa representa la

reacción entre el aceptor dextrana y el grupo catalítico el cual retiene un grupo glucosilo de la sacarosa. Mediante gráficas bifásicas de dobles recíprocos variando las concentraciones de sustrato en presencia o ausencia de inhibidores, demostró que los valores de  $K_M$  pueden cambiar conforme varía la proporción sacarosa/dextrana y el cambio en la afinidad por los sustratos indica competencia entre la sacarosa y la dextrana por el sitio de aceptor. De esta manera es posible que cuando haya un exceso de sacarosa ésta ocupe dos sitios, cambiando significativamente la velocidad de reacción. Todo lo anterior permitiría justificar la existencia de sitios independientes para los aceptores y para los donadores (Kobayashi y Yokoyama 1984, 1986b).

El crecimiento de las cadenas, como puede observarse en la figura 8, se realiza por el extremo no reductor, según fue comprobado por Kobayashi y Matsuda (1978), al observar que la glucoamilasa inhibía la síntesis de glucano, siendo la inhibición consecuencia de la competencia entre la glucoamilasa y la dextransacarasa por el grupo glucosilo del extremo no reductor de la dextrana. Dentro de las diferencias con el mecanismo propuesto por Robyt, destaca en este caso la propuesta de la necesidad de un iniciador para el inicio de la reacción.



A: sitio de unión al aceptor; C: sitio catalítico; D: sitio de unión al donador; X: residuo catalítico (nucleófilo). ● sacarosa; ● glucosa; ○-○-○-○-○-○ dextrana (aceptor).

**Figura 8.** Hipótesis propuesta por Kobayashi (Kobayashi y Matsuda 1986) para explicar el mecanismo de reacción de la dextranasa.

Mooser et al. (1991) basados en resultados de estudios cinéticos, aislamiento de secuencias y en la caracterización de complejos glucosil-enzima, proponen que en el sitio activo de la dextranasa de *Streptococcus* existen dos grupos funcionales que juegan un papel importante en el mecanismo de reacción: sólo un grupo carboxilato (contradiendo la idea de Robyt de dos carboxilos en el sitio activo) que estabiliza el estado de transición, identificado como carboxilo de aspártico y un residuo que facilita la salida de la fructosa a través de la donación de un protón. No propone un mecanismo de reacción pues opina que se necesitan más evidencias estructurales.

### III.6 Estructura de la enzima.

Las proteínas grandes están organizadas en dominios. Esto es debido a que el plegamiento es más flexible cuando ocurre en segmentos discretos, minimizando de esta manera la complejidad estérica y termodinámica que ofrece el plegamiento de una estructura grande. Se ha planteado que la enzima nativa *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F, es un protómero formado por un trímero de 63Kda y por un monómero de 59Kda. Hay grandes discrepancias en cuanto a este dato ya que la presencia de dextrana dificulta la interpretación de resultados y ha dado lugar a conclusiones erróneas (Miller et al. 1986; Fu y Robyt 1990; Kobayashi y Matsuda 1980; Kobayashi y Matsuda 1986a; Robyt 1979; Kim y Robyt 1994).

A pesar de que la vía de síntesis de la dextranasa no se ha esclarecido todavía, varios investigadores han sugerido que la proteína está compuesta por dominios con funciones diferentes, encontrándose la actividad de transferasa y la unión a polímero en dominios distintos.

Recientemente, como consecuencia de la evolución en las técnicas de biología molecular e ingeniería de proteínas, se han realizado numerosos estudios que tratan de dilucidar la estructura del sitio activo con el fin de esclarecer el mecanismo de reacción. Estos estudios se han realizado predominantemente con las glucosiltransferasas (GTF's) de varias especies de *Streptococcus*. Este microorganismo produce enzimas constitutivas (Alsop 1983) que sintetizan polímeros solubles (GTF-S) e insolubles (GTF-I).

Se ha determinado que las enzimas están compuestas por dos dominios funcionales: el dominio N-terminal en el que se localiza la actividad catalítica y el dominio C-terminal en el que se encuentra el segmento de unión al glucano.

Este último no tiene actividad catalítica pero presenta una alta afinidad por la dextrana, la cual conserva aún cuando es escindido del resto de la enzima (Mooser y Wong 1988). Es una región que contiene unidades de repetición (UDR) formadas por aproximadamente 65 aminoácidos los cuales son conservados en las glucosiltransferasas de *Streptococcus* (Wong et al. 1990; Kobayashi et al. 1989). En algunas enzimas, al remover casi todas las UDR (dejando sólo una), se obtiene una proteína únicamente con actividad de sacarasa, la actividad de transferasa no fue detectada (Ferretti et al. 1987; Kato y Kuramitsu 1990). Al eliminar todas las UDR se ocasiona la pérdida total de actividad. En otras enzimas, el perder una unidad debilita de tal manera la unión del glucano que se pierde más del 75% de la actividad (Lis et al. 1995). Las UDR tienen un papel importante mas no exclusivo en la determinación de la naturaleza del polímero producido. Comparando la secuencia de aminoácidos de la GTF-S con la GTF-I de *S. mutans*, se encontró que hay regiones conservadas para cada grupo. Al cambiar seis de estos aminoácidos en la GTF-I por los correspondientes en la GTF-S, la enzima resultante produce una gran cantidad de polímero soluble a diferencia de enzima nativa. De igual manera, al cambiar un sólo aminoácido de la GTF-S por el correspondiente de la GTF-I, se sintetizó polímero insoluble (Shimamura 1994).

Además de estas funciones, se piensa que las UDR participan en la determinación de la dependencia de un "primer" para la síntesis de dextrana. Se han encontrado dextransacarasas de *Streptococcus* que son dependientes de "primer" y los resultados de algunos trabajos sugieren que el extremo carboxiterminal que contiene las UDR juega un papel importante (Nakano y Kuramitsu 1992; Simpson et al. 1995).

En lo que respecta al extremo N-terminal, existe aun bastante incertidumbre. Se han identificado dos residuos de aspártico, a uno de los cuales se une covalentemente la glucosa (Mooser et al. 1991; Mooser e Iwaoka 1989). El otro estabiliza el complejo enzima-sustrato (Funane et al. 1993), y es esencial para la actividad de la enzima, mas no así el residuo de histidina propuesto por Fu y Robyt (1988).

Como consecuencia de la existencia de sitios separados para la unión de sacarosa y dextrana, se ha propuesto que en ausencia de sustrato, los dominios en los que se ubica el sitio de unión no se encuentran correctamente alineados para la catálisis, por lo que la enzima es inactiva. La unión con el sustrato induce un realineamiento conformacional que junta a los dominios para formar el sitio activo. Se sugiere que la dextrana tiene propiedades alostéricas en la síntesis de dextrana, ya que la unión de dextrana a la enzima induce cambios conformacionales de tal manera que queda expuesto el sitio de unión a la sacarosa. Así mismo al unirse la sacarosa a la enzima produce un cambio conformacional que facilita la unión de la dextrana (Mooser e Iwaoka 1989; Funane et al. 1993).

En relación con las dextran-sacarosas de *Leuconostoc mesenteroides*, en la actualidad se realizan múltiples investigaciones, en particular con aquellas de las cepas B-512 y B1299. Se cuenta con la secuencia del gen de la cepa B512 (Houck y Pear 1990), y se está secuenciando el de la B1299 (Monsan 1995). Estos genes ya han sido clonados y expresados en otros microorganismos con

el fin de conocer el mecanismo de la reacción y de producir enzimas constitutivas.

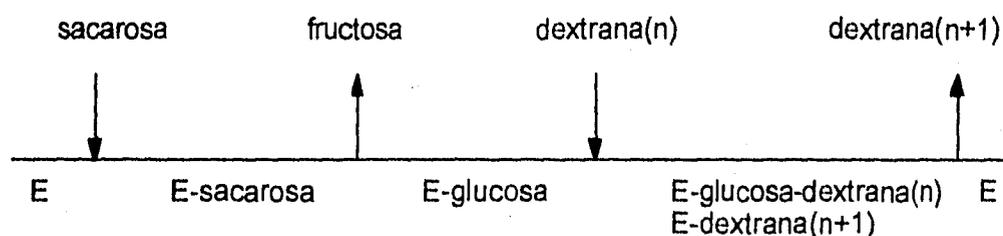
### III.7 Estudio cinético.

Algunos de los fenómenos que caracterizan el comportamiento cinético de la dextranasa son la inhibición por exceso de sacarosa (Hehre 1946; Stringer y Tsuchiya 1958), el aumento de la velocidad de reacción en presencia de aceptores fuertes (efecto que contrarresta al anterior) (Stringer y Tsuchiya 1958), la inhibición por exceso de los mismos (Reh et al. 1990) y el cambio de las constantes cinéticas en función del tipo y concentración del aceptor (Stringer y Tsuchiya 1958, Oriol et al. 1987). Todos los efectos anteriores se han observado en la enzima de la cepa B512F notándose diferencias al ser comparados con lo observado en enzimas de otras cepas (Remaud-Simeon et al. 1994). El escaso conocimiento acerca de la estructura y mecanismo de reacción de la dextranasa ocasiona que las propuestas de modelos cinéticos que expliquen los fenómenos anteriores sean limitados.

Las reacciones más conocidas desde el punto de vista cinético son las de síntesis de polímero. Su descripción cinética se inicia en 1946 (Hehre 1946) al encontrarse que utilizando pequeñas concentraciones de sacarosa (hasta 200mM), la reacción obedece el modelo de Michaelis-Menten, mientras que a concentraciones mayores las velocidades disminuyen. En estudios posteriores se encontró que la disminución de la velocidad de reacción es ocasionada por una inhibición debida al exceso de sustrato. En lo que respecta a las reacciones de aceptor, en los primeros estudios se observó que al agregar  $\alpha$ -metilglucósido (aceptor fuerte) en la mezcla de reacción, la velocidad aumenta, disminuyendo el efecto ocasionado por el exceso en la concentración de

sacarosa. Se propuso entonces, una ecuación que modelaba el comportamiento de la velocidad global de reacción para determinadas concentraciones de aceptor y de sacarosa (Stringer y Tsuchiya 1958). Años más tarde se planteó una ecuación que describía el comportamiento de la reacción global en presencia y ausencia de aceptores y en un intervalo más amplio de concentraciones. Esta ecuación se basa en un mecanismo de inserción, aunque tiene la limitación de no describir el aumento en la velocidad de reacción observado en presencia de aceptores (Ebert y Shenk 1968).

Posteriormente, haciendo una semejanza con la levansacarasa de *Bacillus subtilis*, se propuso que el mecanismo seguido por la dextran sacarasa para la síntesis de polímero era ping-pong Bi-Bi como se ilustra en la figura 9, en donde el polímero actúa como sustrato y producto a la vez (Kobayashi y Matsuda 1978).



**Figura 9.** Esquema del mecanismo ping-pong Bi-Bi propuesto para la dextran sacarasa. E=dextran sacarasa (Kobayashi et al. 1978).

Cuando un sustrato y un producto son muy similares, el comportamiento cinético es diferente al de un mecanismo ping-pong Bi-Bi usual, los procesos de inhibición (por exceso de sustrato y/o producto), se hacen más palpables.

Kobayashi trabajó en un intervalo limitado de concentraciones de dextrana y supuso que con excesos de polímero se presentaría inhibición. Haciendo uso de este hecho, se refutó el mecanismo anteriormente propuesto ya que un exceso de dextrana no inhibía la velocidad de reacción de síntesis de polímero (Mooser, 1985). En este trabajo se propuso un mecanismo secuencial aleatorio de equilibrio rápido para la transferencia de glucosa hacia el polímero en crecimiento. Este mecanismo propone que se forme un complejo enzima-sacarosa-polímero (complejo central) antes de que sea liberada la fructosa. Se han propuesto otras ecuaciones que modelan la cinética de las reacciones de síntesis de oligosacáridos, de los que sólo uno toma en cuenta la inhibición causada por exceso de aceptor (Reh et al. 1990). En general, se trata de modelos complejos basados en el mecanismo de inserción propuesto por Robyt (Böker et al. 1993, Reh et al. 1990), el cual no ha sido comprobado todavía y existen evidencias contr de él (Kobayashi et al. 1978, 1986, 1993 y Mooser et al. 1989, 1991).

### **III.8 Aplicaciones de los glucooligosacáridos.**

La importancia del estudio de las reacciones de aceptor radica en el hecho de que los oligosacáridos han atraído la atención en los últimos años tanto en la investigación básica como en la aplicada. Además de su uso tradicional como fuente de energía o endulzantes se les han encontrado nuevas aplicaciones en la industria alimentaria. El aumento en el conocimiento concerniente al papel de los carbohidratos en la superficie celular y el desarrollo de glicoterapias, además de incrementar el interés en los oligosacáridos, ha generado nuevas

aplicaciones potenciales en el campo de la inmunología (Remaud-Simeon et al. 1994). Los oligosacáridos producidos por la cepa NRRL B1299 han recibido gran atención debido a que la presencia de enlaces  $\alpha(1-2)$  los hace resistentes al ataque de enzimas digestivas. Se ha demostrado que estos glucooligosacáridos no son asimilados en el tracto digestivo, ya que no fueron digeridos por ratas libres de gérmenes que carecían de microflora bacteriana digestiva. Estos azúcares son fermentados por bifidobacterias, bacterias lácticas y *Bacteroides* sp., quienes tienen antagonismo con bacterias patógenas, previniendo su crecimiento. La ingestión de oligosacáridos crea un equilibrio en la flora intestinal limitando el uso de antibióticos. Este mismo principio se ha aplicado a la flora microbiana de la piel. De hecho, las bacterias lácticas en la piel son esenciales para prevenir la presencia de microorganismos patógenos, asociados con problemas como el acné, malos olores, irritaciones, etc. De esta manera, la adición de oligosacáridos en formulaciones dermocosméticas o jabones permite promover el crecimiento de bacterias benéficas. En septiembre de 1993 Liphaderm (subsidiaria de Merck) lanzó al mercado dos líneas de productos que contienen glucooligosacáridos como principio activo (Monsan y Paul 1995).

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### IV.1 Producción de la dextransacarasa.

#### IV.1.1 Microorganismo

La glucosiltransferasa fue producida a partir del cultivo de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B1299. La cepa se obtuvo de la colección de Peoria, Illinois, como parte de un proyecto de colaboración con la compañía BioEurope, Francia. Se partió de células liofilizadas que una vez reactivadas, se conservaron a  $-4^{\circ}\text{C}$  en una solución de glicerol a una concentración de 15%(v/v). Las soluciones así preparadas se utilizaron como inóculos para las fermentaciones a nivel matraz.

#### IV.1.2 Medio de cultivo

La composición del medio de cultivo se presenta en la tabla 1. El pH del medio se ajustó con ácido ortofosfórico antes de esterilizar. Las fermentaciones alimentadas se suplementaron con 0.1% de antiespumante (Silicon 426, Prolabo).

Tabla 1. Composición del medio de cultivo utilizado para *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B1299.

Componente	Concentración (g/l)
Sacarosa	40
Extracto de levadura	20
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	20
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.2
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.02
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.015
MnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.01
NaCl	0.01

#### IV.1.3 Producción de inóculos

La activación del microorganismo se llevó a cabo en matraces de 250ml con 50ml de medio estéril. El microorganismo se creció a 30°C y 200rpm por 12 horas o hasta alcanzar una densidad óptica cercana a 4 medida después de realizar una dilución 1:10. Posteriormente se inoculó en matraces Fernbach de 2 litros con 500 ml de medio estéril, a 200rpm, a una temperatura de 30°C, por 12hrs o hasta alcanzar una densidad óptica cercana a 9. Este cultivo se utilizó como preinóculo para las fermentaciones alimentadas.

El crecimiento del microorganismo se determinó por turbidez a 650nm en un espectrofotómetro Spectronic 601.

#### IV.1.4 Fermentación para la producción de la enzima

La enzima se produjo a través de fermentaciones alimentadas que se llevaron a cabo a nivel planta piloto en un fermentador Microfer Fermentor, New Brunswick Scientific Co., en una jarra de 14 lts y con un volumen de trabajo de 10 lts. Durante la fermentación se reguló el pH a 5.5 con la adición de sacarosa alcalina (sacarosa a una concentración de 400 g/l en una solución de NaOH 2 N). La agitación se mantuvo a 400 rpm, la aireación en 0.5 vvm y la temperatura a 29°C. Se utilizó un inóculo del 10% del volumen total.

Al final de la fermentación el pH se ajustó a 5.4. La concentración de insolubles se determinó por peso seco de una alícuota de 2ml de cultivo. Las células y la actividad asociada a las mismas fueron recuperadas por centrifugación, lavadas con una solución amortiguadora de acetato de sodio, 50 mM, pH 5.4 y posteriormente liofilizadas.

#### IV.2 Determinación de la actividad enzimática.

La actividad de la glucosiltransferasa asociada a células de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B1299, se estimó midiendo los azúcares reductores liberados durante la reacción enzimática en presencia de 10% (w/v) de sacarosa a 30°C y amortiguador de acetato 50 mM, pH 5.4. Los azúcares reductores se determinaron por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) reportado por Sumner (1935). La reacción se lleva a cabo al poner en contacto 10ml de una solución enzimática conteniendo de 0.5 a 2 UI/ml con 2 ml de una solución de sacarosa (600 g/l), para dar lugar a una concentración final de sustrato de 100 g/l.

Una unidad de actividad (UI), se define como la cantidad de enzima que libera un micromol de fructosa por minuto a pH 5.4 y a 30°C.

#### IV.3 Cromatografía de líquidos de alta presión HPLC.

Los análisis de los productos de las reacciones de aceptor (oligosacáridos), se llevaron a cabo en un cromatógrafo Waters-Millipore con detector de índice de refracción Waters 410. Las muestras fueron filtradas previamente a través de membranas de nylon de 4 mm con un tamaño de poro de 0.45 µm.

Para el análisis y cuantificación de oligosacáridos de 4 a 6 unidades de polimerización, se utilizó una columna µBondapak C18 (3.9 x 300 mm), 10 µm Waters-Millipore.

Para la separación y detección de oligosacáridos de hasta 5 unidades de glucosa, la columna se eluyó con agua a un flujo de 0.7 ml/min. Para detectar oligosacáridos de 5 a 8 unidades de glucosa, la columna se eluyó con una mezcla de agua-metanol 94:6 (v/v) a un flujo de 0.7 ml/min.

Para el análisis y cuantificación de mono y disacáridos se utilizó una columna de sílica aminada (análisis de carbohidratos), (3.9 x 300 mm), 10µm, Waters-Millipore. El eluyente en este caso fue una mezcla de acetonitrilo-agua 75:25 a un flujo de 1.3 ml/min.

#### IV.4 Rendimiento de oligosacáridos.

El cálculo del rendimiento en la producción de oligosacáridos se obtuvo a partir de la relación definida por Paul et al. (1986):

$$Y_{\text{oligosacáridos}} = \frac{\text{oligosacáridos (g/l)}}{\text{maltosa (g/l)} + 0.474 \text{sacarosa (g/l)}}$$

donde 0.474 de la sacarosa corresponde a la glucosa que es transferida a los oligosacáridos. Para relaciones sacarosa/maltosa (s/m) menores; la concentración de maltosa se iguala a la de sacarosa obteniéndose la siguiente ecuación:

$$Y_{\text{oligosacáridos}} = \frac{\text{oligosacáridos (g/l)}}{\text{sacarosa (g/l)} + 0.474\text{sacarosa (g/l)}}$$

#### **IV.5 Consumo de sacarosa.**

El consumo de sacarosa se determinó midiendo la concentración de sacarosa en las mezclas de reacción por medio de un analizador bioquímico YSI 2700 Select (EU), que tiene invertasa y glucosa oxidasa inmovilizadas en membranas.

#### **IV.6 Síntesis de oligosacáridos.**

Los siguientes ensayos se realizaron por duplicado, utilizando a la enzima dextranasa asociada a células de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B1299.

Las síntesis de oligosacáridos se llevaron a cabo a 30°C utilizando un amortiguador de acetatos 50 mM, pH 5.4, conteniendo 50 ppm de azida de sodio, la cual evita el crecimiento celular y no afecta la actividad de la glucosiltransferasa.

La enzima se inactivó calentando las muestras a ebullición por 5 min.

Las concentraciones de reactivos (sacarosa y maltosa) así como las relaciones s/m variaron dependiendo de los experimentos.

a) Para determinar el efecto de la concentración en el rendimiento de oligosacáridos, se utilizó una relación s/m=1 y las concentraciones de los reactivos se encontró en el intervalo de 57-260 g/l con 3 UI/ml de enzima.

b) Para determinar el efecto de la relación s/m en el rendimiento de oligosacáridos, se utilizaron 3 UI/ml de enzima y las siguientes variables:

**Tabla 2.** Concentración de reactivos involucrados en la determinación del efecto de la relación s/m sobre el rendimiento de oligosacáridos.

Relación s/m	sacarosa (g/l)	maltosa (g/l)
1	380	380
0.75	300	400
0.5	200	400

c) Las reacciones con relación s/m=0.05 se realizaron utilizando 1.2 UI/ml de enzima, 34.2 g/l de sacarosa y 684 g/l de maltosa a 25°C.

Todas las reacciones anteriores se realizaron en lote.

El porcentaje de sacarosa transformado en dextrana se obtuvo a través de la diferencia entre el porcentaje de sacarosa consumida y el porcentaje de sacarosa transformada en oligosacáridos.

d) Reacciones alimentadas:

En estas reacciones la enzima fue colocada en una solución de maltosa con una concentración de 533 g/l, la cual fue alimentada con una solución de 800 g/l de sacarosa. Se utilizaron velocidades de alimentación de 3.125 ml/hr por

un tiempo de 8 hrs y 1.041 ml/hr por un tiempo de 24 hrs. La actividad enzimática volumétrica así como las concentraciones de sacarosa y maltosa variaron a través del tiempo. Las condiciones finales fueron: 3 UI/ml de actividad enzimática, relación s/m=0.5, sacarosa 200 g/l y maltosa 400 g/l.

#### **IV.7 Purificación de panosa.**

La purificación se realizó a través de cromatografía por permeación en gel. El soporte utilizado fue Biogel P2 (Biorad) fino, con tamaño de corte de 100-1800 daltons (el peso molecular de los azúcares involucrados en la mezcla a purificar se encuentran en el intervalo de 180-828 g/gmol). Como fase móvil se utilizó agua Milli Q, con un flujo de 0.25 ml/min. La temperatura del sistema fue de 65°C. Se utilizó una columna enchaquetada con 1.5 cm de diámetro y 95 cm de largo.

La mezcla de reacción elegida para tal proceso fue sintetizada utilizando una relación s/m=0.5 (200 g/l de sacarosa y 400 g/l de maltosa), en un periodo de 12 hrs., con 3 UI/ml de enzima asociada a células de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B1299, a 30°C. La muestra fue diluida 4 veces y filtrada a través de una membrana de nylon de 4 mm, con un tamaño de poro de 0.45 µm.

La muestra diluida contenía una concentración total de carbohidratos de 98 g/l, de los cuales 31.25 eran panosa.

#### **IV.8 Reacciones con dextranasa y pululanasa.**

Se aplicaron 10 µl de la solución enzimática comercial de dextranasa (Amano, Chem. Co., distribuido por Enzimas y productos químicos de México)

(actividad no reportada), a 50  $\mu$ l de una mezcla de reacción que contenía 600 g/l de carbohidratos. La reacción se llevó a cabo a 50°C por 1 hora, posteriormente se eliminó la actividad enzimática al calentar a ebullición por 5 min.

Para la pululanasa se siguió el mismo procedimiento sólo que la incubación fue a 40°C.

#### **IV.9 Cromatografía en placa fina.**

Las fracciones obtenidas de la purificación de panosa, se analizaron inicialmente por cromatografía en capa fina. Se utilizaron placas de sílica gel HP-K de 10 x 10 cm Whatman.

Las placas fueron impregnadas con una mezcla que contenía dietanolamina 0.1 M y 10 mM de ácido acético en acetonitrilo y posteriormente activadas a temperatura ambiente por 1hr.

La fase móvil contenía butanol-etanol-agua con proporciones 3:5:2 (v/v). El tiempo de corrida fue de 1hr.

El revelador contenía 4% de  $\alpha$ -naftol en etanol, ácido sulfúrico y agua con las proporciones 8:1:1 (v/v), respectivamente. El revelado de las placas se realizó a 100°C.

Las placas una vez reveladas fueron analizadas por densitometría.

#### **IV.10 Cinética de las reacciones de aceptor.**

Las mezclas de reacción contenían 1 UI/ml de enzima asociada a células de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B1299, sacarosa con concentraciones en el

intervalo de 10-300 g/l, concentraciones fijas de maltosa (Merck) de 50 y 100 g/l o panosa (Sigma) 50 g/l. Las reacciones se realizaron a 30°C.

La velocidad total de reacción se midió como liberación de fructosa a través de un ensayo enzimático de Boehringer para medir fructosa y glucosa.

La velocidad de síntesis de dextrana se obtuvo por la substracción de la velocidad de síntesis de oligosacáridos a la velocidad global de reacción.

Los ensayos se realizaron por duplicado y los valores de las desviaciones estándar se encontraron por debajo del 5%.

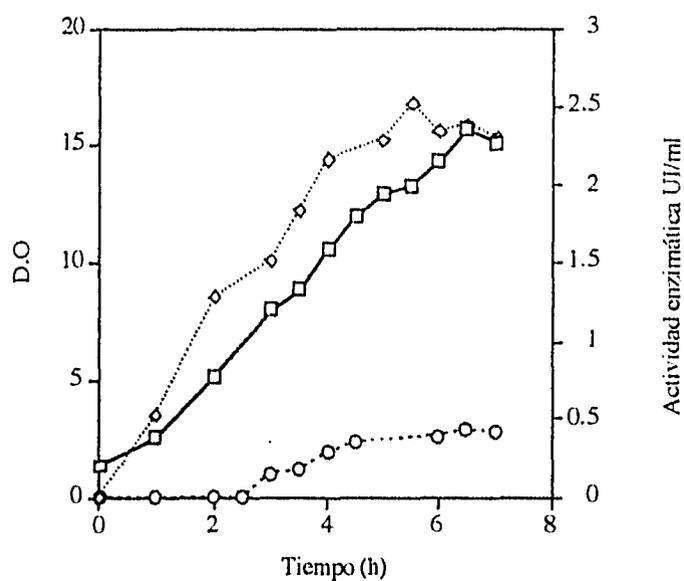
## V RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### V.1 Producción de la dextransacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B1299.

Con el fin de estudiar la cinética de producción de la dextransacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B1299 y obtener enzima suficiente para realizar los experimentos posteriores, se realizó una fermentación alimentada de 10 litros. Para mantener baja la concentración de sacarosa en el medio de cultivo durante la fermentación, se siguió la metodología propuesta por López y Monsan (1980) y por Remaud-Simeon et al., (1994). Lo anterior se logra por la adición continua de sacarosa regulada con el consumo de álcali durante la fase logarítmica de crecimiento del microorganismo. A través de este proceso se incrementa la producción de la enzima y se evita el proceso de represión catabólica.

Como puede apreciarse en la figura 10, la producción de la enzima ligada a la fracción insoluble del cultivo está asociada al crecimiento, ya que existe una relación directa entre la cantidad de células y la cantidad de enzima asociada a éstas, es decir, la actividad específica es constante. En lo que respecta a la actividad extracelular, en el inicio no es detectable, sin embargo, a partir de la tercera hora se empieza a producir. Hay varias hipótesis para explicar este fenómeno, siendo la más probable el que exista un péptido de anclaje a la membrana que posteriormente es escindido ocasionando la liberación de la actividad (Kok 1990).

Los rendimientos de la fermentación se reportan en la tabla 3. La actividad enzimática asociada a las células es denominada "actividad insoluble".



—□— D.O.    ····△···· Actividad insoluble (UI/ml)    ····○···· Actividad soluble (UI/ml)

**Figura 10.** Cinética de una fermentación típica alimentada con la cepa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B1299.

**Tabla 3. Balance de la producción de la enzima glucosiltransferasa por fermentación alimentada de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B1299.**

Volumen de fermentación	10 litros
Actividad total glucosiltransferasa	2.71 UI/ml
Actividad extracelular	0.424 UI/ml
Porcentaje de la actividad en la fracción extracelular.	15.6%
Actividad específica de la fracción insoluble	0.353 UI/mg biomasa
Concentración de insolubles	6.5 mg/ml
Actividad insoluble	2.29 UI/ml
Porcentaje de la actividad en la fracción insoluble	84.4%

## **V.2 RENDIMIENTO Y DISTRIBUCIÓN DE LOS PRODUCTOS DE LAS REACCIONES DE ACEPTOR.**

La síntesis de oligosacáridos a través de las reacciones de aceptor puede ser controlada dependiendo de las necesidades del producto. Las variables a controlar son el rendimiento y distribución de pesos moleculares de los oligosacáridos, así como el rendimiento de dextrana.

En la siguiente sección se evaluaron los efectos de la concentración de sustratos (sacarosa y maltosa) y la utilización de diversas relaciones sacarosa/maltosa, sobre el rendimiento y distribución de los productos de las reacciones de aceptor.

### **V.2.1 Efecto de la concentración de reactivos**

El efecto de la concentración de sustrato se evaluó para la sacarosa (s) y la maltosa (m) manteniendo la relación s/m constante ( $s/m=1$ ) y utilizando concentraciones de ambos azúcares en el intervalo de 57-260 g/l. Las reacciones se siguieron hasta alcanzar un consumo del 50% de la sacarosa inicial. Como primera conclusión, es conveniente señalar que no se observaron cambios en los rendimientos de los oligosacáridos al aumentar la concentración de reactivos, como puede apreciarse en la tabla 4. En efecto, se observa que la cantidad de sacarosa empleada para la síntesis de oligosacáridos y dextrana es semejante en los cuatro experimentos descritos, de donde se concluye que la concentración de azúcares no es un parámetro que afecte el rendimiento de los productos de las reacciones de aceptor.

**Tabla 4. Efecto de la concentración de reactivos sobre el rendimiento y producción de oligosacáridos y dextrana.**

Sacarosa (g/l)	$X_{\text{sacarosa}}$	y DP3	y DP4 $\alpha(1-2)$	y DP4 $\alpha(1-6)$	y DP5	% oligosac <sup>a</sup>	% dextrana <sup>b</sup>	Relación oligosac/dex
260	47	17	1.6	2	0.5	23	24	0.95
221	55	17	1.2	1.5	0.3	22	33	0.66
120	53	15	0.9	1.6	0.4	20	33	0.60
57	49	16	1.2	1.9	0.3	20	29	0.68

Condiciones de reacción: s/m=1, 3 UI/ml.

<sup>a</sup> % de sacarosa transformada en oligosacáridos.

<sup>b</sup> % de sacarosa transformada en dextrana.

### V.2.2 Efecto de bajas relaciones sacarosa/maltosa (s/m) sobre los productos de la reacción.

Mediante experimentos similares a los antes descritos, se estudió el efecto de la variación en la relación s/m sobre el rendimiento de oligosacáridos. Se encontró que el rendimiento se incrementa al disminuir el valor de dicha relación, es decir cuando la maltosa se encuentra en un exceso molar en relación con la sacarosa. Dongling y Robyt (1993), reportaron que utilizando la enzima de la cepa B512, en una reacción en lote con una relación s/m=0.05, (34.2 g/l de sacarosa, 684 g/l de maltosa), se produce panosa con un rendimiento igual al 100%. Con el fin de observar si la enzima de la cepa B1299 tenía un comportamiento similar, se realizó una síntesis en las condiciones descritas. En este caso el rendimiento en panosa resultó ser bastante inferior al 100%, ya que se obtuvo 57% para panosa y 28% para el producto que resulta de la transferencia sobre panosa, el DP4. Este resultado, así como los obtenidos con relaciones s/m mayores se concentran en la figura 11. Podría concluirse que es extremadamente improbable que con la enzima B1299 se produzca panosa exclusivamente, ya

que su capacidad como aceptor es muy elevada apareciendo el DP4 en los productos. En la figura 12 se muestran los cromatogramas que indican la evolución de la panosa y el DP4 durante la reacción para la relación s/m=0.05.

**Tabla 5. Utilización de diferentes relaciones s/m.**

s/m	sacarosa (g/l)	X <sub>sac.</sub>	y DP3	y DP4 $\alpha(1-2)$	y DP4 $\alpha(1-6)$	y DP5 $\alpha(1-2)$	% olig <sup>a</sup>	% dex <sup>b</sup>
1	380	75	21	6	6	6	50	37
0.75	300	77	36	8	6	5	66	11
0.5	200	94	42	16	5	7	86	8
0.05 <sup>c</sup>	34.2	100	57	28	0	0	100	0
0.05 <sup>d</sup>	34.2	100	100	0	0	0	100	0

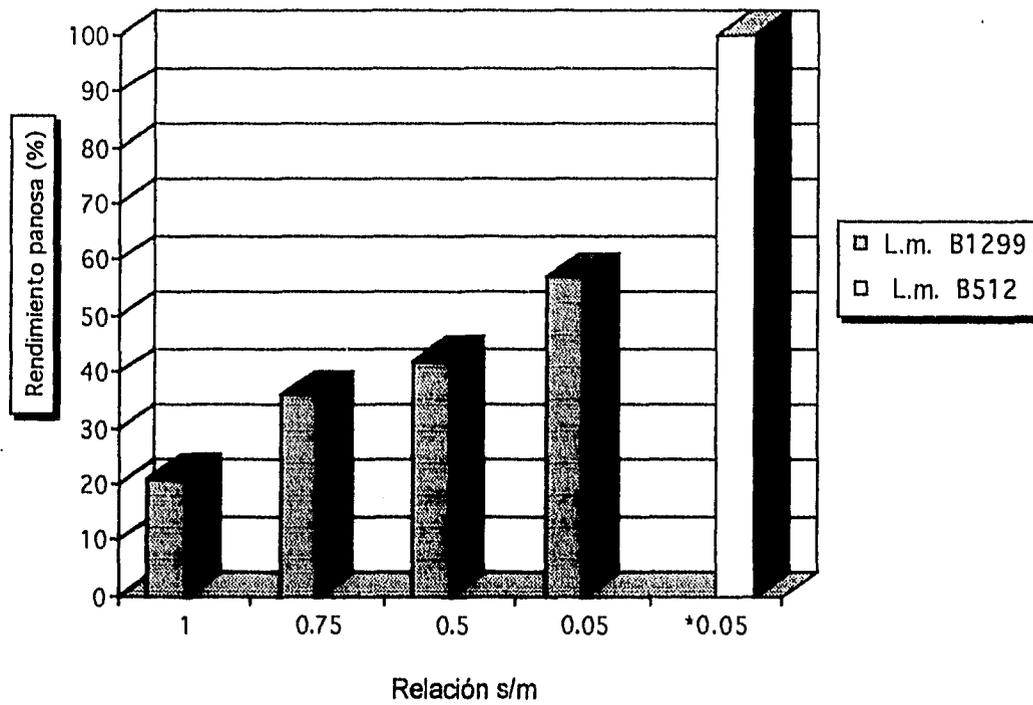
Condiciones de reacción: 3 UI/ml, 30°C. n=1

<sup>a</sup> % de sacarosa transformada en oligosacáridos.

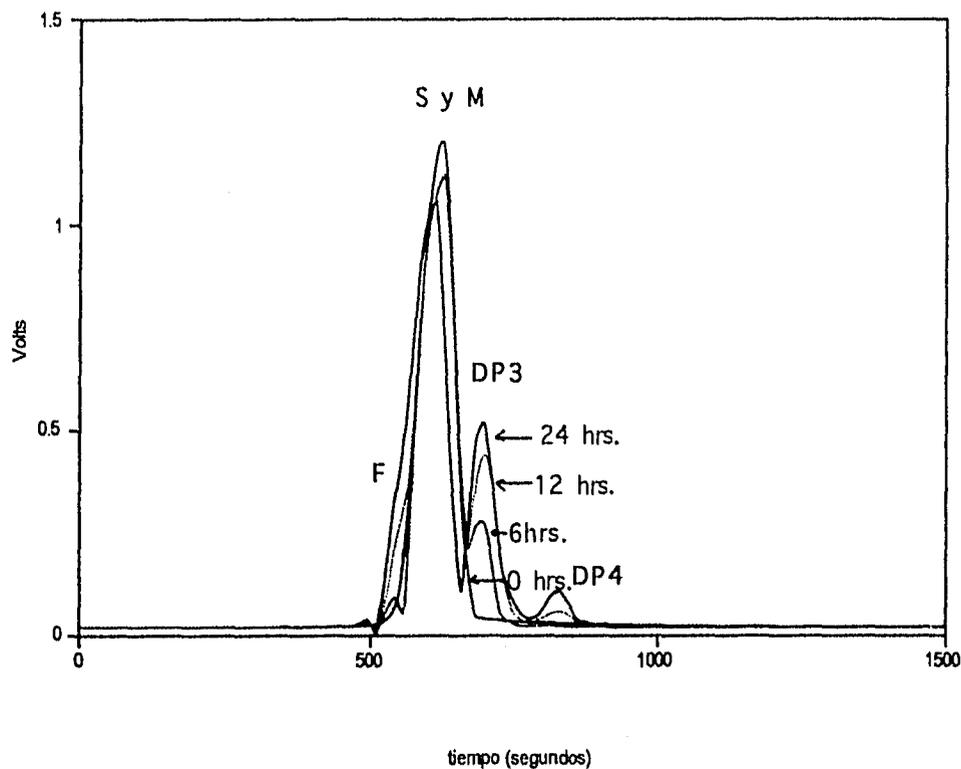
<sup>b</sup> % de sacarosa transformada en dextrana, (sacarosa consumida - sacarosa transformada en oligosacáridos).

<sup>c</sup>Enzima cepa B1299, 1.2 UI/ml, 25°C.

<sup>d</sup>Enzima cepa B512, 1.2 UI/ml, 25°C (Dongling y Robyt 1993).



**Figura 11.** Efecto de la relación s/m sobre el rendimiento de panosa.  
 s/m=1, 380 g/l sacarosa, 380 g/l maltosa, 3 U/ml, 30°C; s/m=0.75, 300 g/l sacarosa, 400 g/l maltosa, 3 U/ml, 30°C; s/m=0.5, 200 g/l, 400 g/l maltosa, 3 U/ml, 30°C; s/m=0.05, 34.2 g/l sacarosa, 684 g/l maltosa 1.2 U/ml, 25°C; \*dato reportado en la literatura, s/m=0.05, 34.2 g/l sacarosa, 684 g/l maltosa, 1.2 U/ml, 25°C (Dongling y Robyt 1993).



F= fructosa, S= sacarosa, M= maltosa.

**Figura 12.** Evolución de la síntesis de panosa (DP3) y el DP4 en una reacción con relación  $s/m=0.05$ , utilizando a la enzima de la cepa de *Leuconostoc mesenteroides* B1299. Columna  $\mu$ Bondapak C18, eluyente agua, flujo 0.7ml/min.

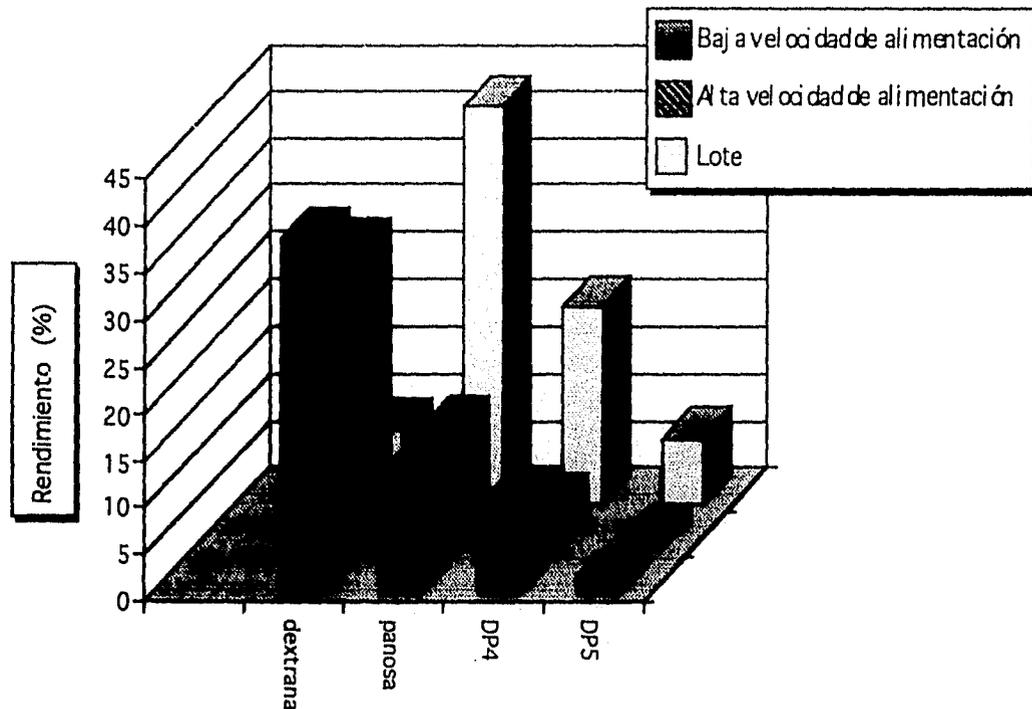
### V.2.3 Reacciones alimentadas.

Se utilizó a la concentración de panosa como parámetro del control del peso molecular de la mezcla de reacción, debido a que es el primer oligosacárido

sintetizado en las reacciones donde se utiliza a la maltosa como aceptor y a partir de este trisacárido se sintetizan los demás. Un control extremo del peso molecular se llevaría a cabo sintetizando únicamente panosa.

De acuerdo a los resultados anteriores, la estrategia para aumentar el rendimiento de panosa y disminuir el de otro tipo de oligosacáridos, es tener una relación  $s/m \rightarrow 0$ . Por lo tanto, una opción para cumplir con este requisito es la de utilizar reacciones alimentadas, en las que la enzima se encuentra inicialmente en una solución concentrada de maltosa y se le alimenta sacarosa. Se realizaron estas reacciones utilizando un flujo rápido (3.125 ml/hr) y uno lento (1.041 ml/hr) determinados a partir de las velocidades de reacción esperadas para la concentración de enzima utilizada. Los resultados son similares para los dos flujos y diferentes a lo previsto, ya que mientras que el consumo de sacarosa fue muy bajo, los rendimientos de oligosacáridos fueron menores a los obtenidos con las reacciones en lote, presentándose una gran cantidad de dextrana según puede apreciarse en la figura 13. El nivel de consumo de sacarosa puede deberse a que hay poca sacarosa en el medio, por lo que al no estar saturada la enzima la velocidad de reacción resulta baja, aunado a una posible inhibición por la elevada concentración de maltosa empleada. Sin embargo, no existe una justificación para los rendimientos de oligosacáridos y dextrana. Al parecer a través de la relación  $s/m$  se logra controlar el peso molecular de los productos de reacción (figura 11), sin embargo no al extremo reportado en la literatura (Dongling y Robyt 1993). Las reacciones alimentadas indican que la concentración de maltosa no es un factor definitivo en el control de la síntesis de dextrana en las reacciones de aceptor. Parece existir un límite en la concentración de sacarosa, por debajo del cual la enzima se hace más afín a la

síntesis de dextrana que a la de oligosacáridos aún en presencia de altas concentraciones de maltosa. Se requiere sin duda de mayor experimentación para encontrar una explicación a este resultado.



**Figura 13.** Comparación de rendimiento de los productos de las reacciones en lote y alimentadas

Reacción en lote:  $s/m=0.5$ , 200 g/l sacarosa, 400 g/l maltosa, 3 UI/ml, 30°C.

Reacciones alimentadas:

Condiciones iniciales: concentración maltosa 533 g/l, sacarosa alimentada 800 g/l, 4 UI/ml, 30°C.

Condiciones finales: concentración sacarosa 200 g/l, maltosa 400 g/l, 3 UI/ml

Alta velocidad de alimentación: 3.125 ml/hr, 8 hrs de reacción.

Baja velocidad de alimentación: 1.041 ml/hr, 24 hrs de ración.

### V.3 PURIFICACIÓN DE PANOSA.

Con el fin de estudiar la cinética de las reacciones de aceptor en presencia de panosa es necesario el empleo de reactivos puros. Por esta razón, en una primera etapa y considerando la facilidad para su producción se decidió purificarla.

#### V.3.1 Mezclas de reacción.

Con el fin de simplificar la composición de las mezclas de reacción y facilitar el proceso de purificación, se utilizaron dos glucosidasas con afinidad a polímeros y a enlaces  $\alpha(1-6)$ : dextranasa y pululanasa. Sin embargo, como consecuencia de la presencia de enlaces  $\alpha(1-2)$  en los oligosacáridos, se encontró que la dextranasa hidroliza a la panosa manteniendo intactos a los otros oligosacáridos. En lo que respecta a la pululanasa, se observó que sólo hidroliza azúcares de alto peso molecular, aumentando la cantidad de glucosa y DP4  $\alpha(1-2)$ . Con ninguna de estas enzimas se logró reducir la cantidad de productos secundarios, como puede apreciarse en el tabla 6.

Las mezclas de reacción elegidas para el proceso de purificación fueron sintetizadas utilizando una relación  $s/m=0.5$  (200 g/l sacarosa y 400 g/l de maltosa), y diluidas 4 veces de tal manera que contenían 98 g/l de carbohidratos de los cuales 31.25 g/l eran de panosa.

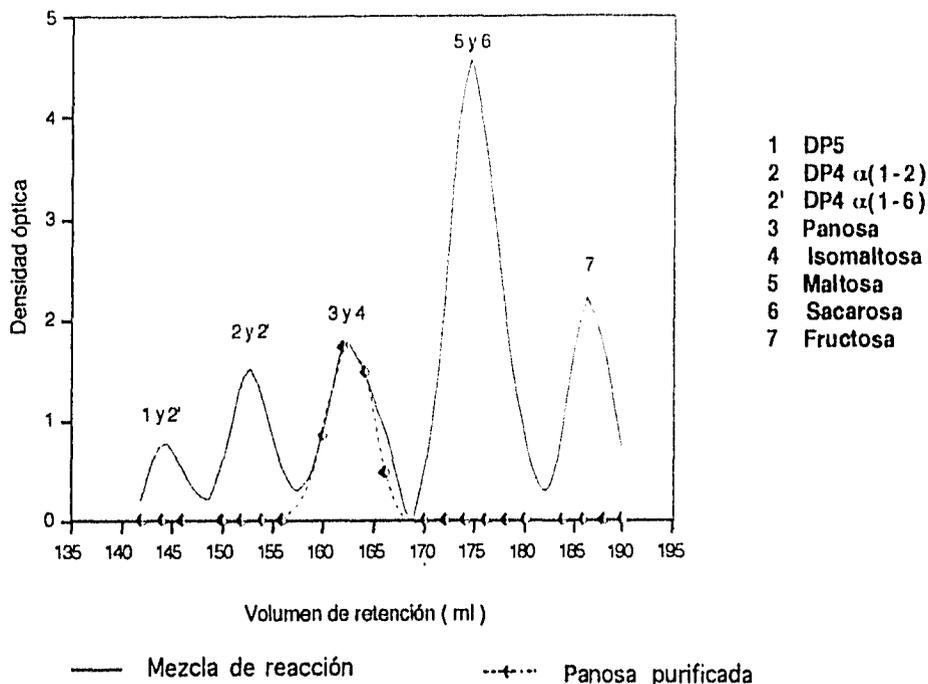
**Tabla 6. Hidrólisis de productos de reacciones de aceptor con alto contenido de panosa empleando pululanasa y dextranasa.\***

	sacarosa g/l	panosa g/l	DP4 g/l $\alpha(1-2)$	DP4 g/l $\alpha(1-2)$	DP4 g/l $\alpha(1-2)$	glucosa g/l
Control	0.035	125	31	15	20	0
Pululanasa*	0.029	116	73	15	19	24
Dextranasa*	0.028	103	28	12	17	65

\*El sistema de reacción contenía 20% v/v de solución comercial de enzima (actividad no reportada).

### V.3.2 Cromatografía por permeación en gel.

Para el proceso de purificación se utilizó cromatografía por permeación en gel utilizando como soporte Biogel P2 (Biorad). A través de este proceso se logró obtener panosa con un 96% de pureza, siendo el principal contaminante la isomaltosa. En la figura 14 se observa el perfil de purificación de la panosa, la separación de los picos 1 y 2', 2 y 2', 3 y 4, 5 y 6, fue posible a través de cromatografía en placa fina. El principal problema de este proceso es la velocidad de flujo, la baja reproducibilidad y los problemas constantes de burbujas. Por no ser este el objetivo del trabajo, no se investigó más sobre otros soportes que pudieran emplearse para la separación, si no que se adquirió la panosa directamente en Sigma.



**Figura 14.** Perfil de purificación de panosa por medio de cromatografía por permeación en gel. Condiciones de trabajo: Biogel P2, 65°C, flujo 0.25 ml/min. La separación de los picos 1 y 2', 2 y 2', 3 y 4, 5 y 6 fue a través de cromatografía en placa fina. Los resultados de densidad óptica fueron obtenidos a través de un densitómetro.

#### V.4 CINÉTICA DE LAS REACCIONES DE ACEPTOR.

Se realizó un estudio cinético en donde se evaluó tanto el efecto de la concentración y tipo de aceptor como el efecto de la concentración de sacarosa sobre la velocidad de reacción y calidad de los productos de la enzima dextranasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B1299.

##### V.4.1 Velocidad global de reacción.

La velocidad total de la reacción fue medida a partir de la liberación de fructosa. Para tal efecto se consideró despreciable la formación de leucrosa, debido a que

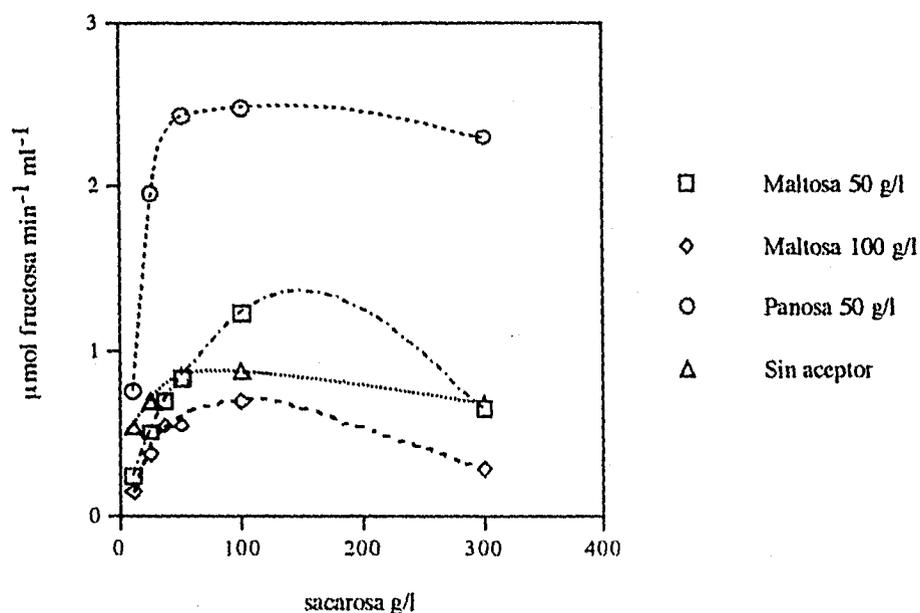
no se logró detectar su presencia ya que la fructosa es muy mal aceptor en comparación con la maltosa. Se observó el efecto que ejercen la maltosa y la panosa sobre la velocidad de reacción (reacciones de dos sustratos) y se comparó con el comportamiento mostrado por la reacción sin aceptor, (empleando sólo sacarosa como sustrato).

Se utilizaron dos concentraciones de maltosa: 50 y 100 g/l. El comportamiento cinético de la enzima en presencia de 50 g/l de maltosa, es semejante al observado en la reacción sin aceptor, según puede apreciarse en la figura 15. Cuando se utilizó 100 g/l de maltosa se observó una disminución en la velocidad de reacción, comprobándose que excesos de maltosa inhiben la velocidad global de reacción. Sin embargo, este resultado no identificaba el tipo de reacción inhibida, si la producción de oligosacáridos, la producción de dextrana o ambas.

En lo que respecta a la panosa como aceptor, se observó un aumento considerable en la velocidad global de reacción, como se aprecia también en la figura 15. Reamaud-Simeon et al., (1994), reportaron que a diferencia de las enzimas solubles de las cepas B512 y B1299, la enzima asociada a células de la cepa B1299 no aumenta la velocidad de reacción en presencia de maltosa. En dicho artículo la causa de este efecto se atribuyó a problemas difusionales de sustrato. De acuerdo a los resultados de las cinéticas con panosa se puede descartar el problema difusional ya que la panosa es una molécula más grande que la maltosa y por lo tanto difundiría con mayor dificultad que esta última. Sin duda es otra la causa de este fenómeno, la cual pudiera estar relacionada con diferencias en la conformación de la enzima libre y asociada a células.

Los resultados indican un aparente aumento en la afinidad de la enzima por la sacarosa en presencia de panosa. Oriol et al., (1987), realizaron un estudio en el

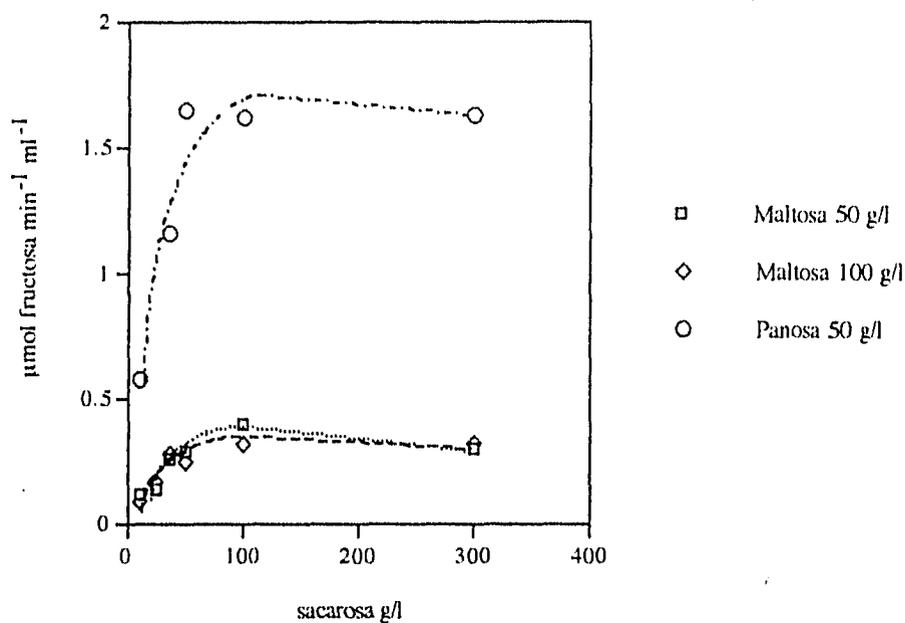
que se midió la velocidad de reacción de la enzima de la cepa B512 en presencia de oligosacáridos pertenecientes a la serie homóloga sintetizada cuando la maltosa es aceptor (maltooligosacáridos de 3, 4 y 5 unidades de glucosa en forma pura). En dicha investigación se encontró que los oligosacáridos son buenos aceptores, ya que ocasionan un aumento en la afinidad por la sacarosa, aunque también se encuentra una disminución de la velocidad de reacción. Como se podrá observar en la figura 15, el comportamiento cinético de la enzima de la cepa B1299 es diferente al de la B512.



**Figura 15.** Efecto de la maltosa y la panosa en la velocidad inicial global de reacción catalizada por la dextranasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B1299 (1 UI/ml, 30°C).

#### **V.4.2 Cinéticas de producción de oligosacáridos.**

El comportamiento cinético de la producción de oligosacáridos, fue analizado bajo las mismas condiciones que la velocidad global de reacción. En las reacciones con maltosa, se obtuvo un solo oligosacárido: la panosa y el comportamiento cinético fue semejante para las dos concentraciones, como se aprecia en la figura 16. Al parecer, la maltosa no ejerce un efecto importante sobre la velocidad de síntesis de oligosacáridos. Sin embargo, la reacción con panosa presenta velocidades iniciales superiores a las observadas con maltosa, y los oligosacáridos formados cuando este azúcar es el aceptor presentan grados de polimerización de 4, 5 y 6 unidades de glucosa. Estos resultados concuerdan con otros reportes en la literatura (Paul et al., 1986) donde se afirma que mediante la utilización aceptores de mayor peso molecular se aumenta el peso molecular y el índice de dispersión de los productos de las reacciones de aceptor para enzima de la cepa B512.

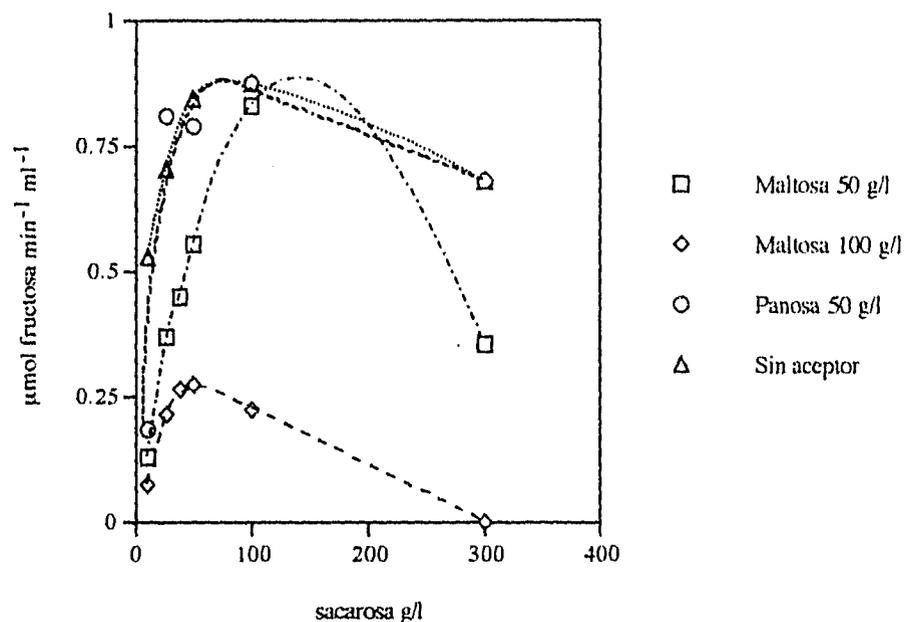


**Figura 16.** Efecto de la panosa y la maltosa en la velocidad inicial de reacción de síntesis de oligosacáridos (1 UI/ml, 30°C).

#### V.4.3 Cinética de producción de dextrana.

La velocidad inicial de síntesis de dextrana fue obtenida a través de la resta de la velocidad de producción de oligosacáridos a la velocidad de liberación de fructosa. Los resultados se reportan en la figura 17 donde puede apreciarse que cuando hay un exceso en la concentración tanto de maltosa (100 g/l) como de sacarosa (300 g/l), se llega a inhibir completamente la síntesis de dextrana. En la reacción con 50 g/l de maltosa no se alcanza una inhibición total, pero es claro que en general la velocidad es más lenta que la velocidad de la reacción sin aceptor. En lo que respecta a la panosa, la velocidad inicial de producción de

dextrana en presencia de este aceptor es muy semejante a la velocidad observada de la reacción sin aceptor.



**Figura 17.** Efecto de la panosa y la maltosa en la velocidad inicial de reacción de síntesis de dextrana (1 UI/ml, 30°C).

Evidencias experimentales indican que excesos de sacarosa inhiben la producción de dextrana, y se producen azúcares de menor peso molecular (Robyt et al., 1993). Dongling y Robyt (1993), publican un artículo un poco contradictorio, ya que indica que con relaciones  $s/m \rightarrow 0$  se inhibe la síntesis de dextrana y sólo se producen oligosacáridos, es decir que el sólo tener una alta concentración de maltosa sin importar la concentración de sacarosa, inhibe la síntesis de polisacárido. Como se puede observar, con la enzima de la cepa B1299 asociada a células, sólo es posible inhibir totalmente la síntesis de

dextrana cuando la reacción se lleva a cabo con 1.2 UI/ml de enzima y con 684 g/l de maltosa (tabla 5). Al emplear concentraciones menores de este azúcar, incluyendo las reacciones alimentadas siempre se obtuvo dextrana. Los resultados de este estudio cinético indican que si bien es claro que un exceso de maltosa inhibe la síntesis de dextrana, este fenómeno se manifiesta de manera mas clara en condiciones de exceso también de sacarosa y una relación  $s/m=3$ . En esta sección se evaluó la velocidad de reacción en condiciones iniciales, por lo que fenómenos como la síntesis de DP4 y DP5, así como las variaciones en la concentración de sacarosa y maltosa no fueron tomados en cuenta. Por lo tanto estos resultados no son comparables con los de la sección V.2.1 en donde se evaluó el efecto de la concentración de sacarosa y maltosa a final de una reacción en lote.

Por lo que respecta al control del peso molecular de los oligosacáridos, en estas reacciones sólo se produjo panosa (tomar en cuenta que se trabajó en velocidades iniciales). El control de la producción de dextrana y del peso molecular de los oligosacáridos, no sólo se puede llevar a cabo al utilizar relaciones  $s/m \rightarrow 0$ , sino que también utilizando relaciones  $s/m$  mayores a uno pero combinando los efectos inhibitorios en la síntesis de dextrana causados por los excesos de sacarosa y maltosa (en velocidades iniciales).

La panosa tiene un comportamiento cinético completamente diferente a la maltosa. La enzima parece presentar una mayor afinidad por la panosa que por la maltosa, tanto para la producción de oligosacáridos como para la producción de dextrana. En presencia de panosa no se sacrifica la producción de dextrana por la producción de oligosacáridos, por lo que tal parece que siguen vías diferentes. Debido al escaso conocimiento acerca de la estructura de la enzima,

varias hipótesis explican el comportamiento observado: la primera plantea que los sitios de síntesis de dextrana y de producción de oligosacáridos sean diferentes y que en presencia de maltosa el primero se vea afectado, la segunda propone que estos fenómenos sean ocasionados porque las moléculas difieran en la manera de unirse al sitio activo.

#### **V.4.4 Análisis de la síntesis de dextrana en las reacciones alimentadas.**

El mecanismo de reacción propuesto por Robyt explica la síntesis de oligosacáridos a través de la unión de la molécula aceptor a un sitio específico, que al ser ocupado impide la interacción de los nucleófilos que participan en la síntesis de dextrana. Con este mecanismo propone que altas concentraciones de aceptor en el medio de reacción inhiben la síntesis de dextrana. Nuestros resultados apoyan en inicio este mecanismo, sin embargo el resultado de las reacciones alimentadas no concuerda con tal, ya que al haber un alto contenido de maltosa en el medio, la síntesis de dextrana sería casi imposible. Por otro lado, en las cinética de síntesis de dextrana se observa que con altas concentraciones de sacarosa (300 g/l), y de maltosa (100 g/l), fue posible inhibir la síntesis de polímero.

Por otro lado el mecanismo de Kobayashi implicaría competencia entre la maltosa y la dextrana por el sitio de unión al aceptor, al haber un exceso de maltosa en las reacciones alimentadas, la síntesis de dextrana sería irrealizable. Nuestros resultados no son explicados con los mecanismos de reacción propuestos. Hace falta mucha investigación a cerca del funcionamiento y estructura de la enzima para que de esta manera se optimicen procesos de

síntesis o bien a través de ingeniería de proteínas se construyan enzimas más eficientes.

## VI CONCLUSIONES

Las reacciones de síntesis de oligosacáridos en las condiciones estudiadas no son afectadas por la concentración de maltosa y sacarosa.

La relación  $s/m$  influye sobre el control del peso molecular de la mezcla de reacción, sin embargo a diferencia de lo que ocurre con la enzima B512, en las condiciones de reacción estudiadas la enzima B1299 no produce panosa exclusivamente aún utilizando relaciones  $s/m \rightarrow 0$ . La panosa tiene una elevada capacidad de aceptor apareciendo DP4 y otros oligosacáridos en los productos.

Por lo que respecta al comportamiento cinético de la dextranasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B1299 asociada a células, en presencia de maltosa se observa que la velocidad global de reacción es semejante a la velocidad de reacción en ausencia de aceptor. Este comportamiento es disímil al presentado por la enzima de la cepa B512.

La maltosa tiene un efecto inhibitorio sobre la velocidad de síntesis de dextrana sin afectar la velocidad de síntesis de oligosacáridos.

La síntesis de dextrana en las reacciones de producción de oligosacáridos empleando a la maltosa como aceptor se puede eliminar utilizando una relación  $s/m=3$  con altas concentraciones de reactivos (sacarosa 300 g/l, maltosa 100 g/l), debido a que se combinan los efectos inhibitorios ocasionados por el exceso de sacarosa y maltosa.

La panosa provoca un comportamiento cinético diferente a la maltosa, aumenta la velocidad de síntesis de oligosacáridos sin disminuir la velocidad de síntesis de dextrana, ya que la síntesis de polímero en presencia de panosa sigue el mismo comportamiento cinético que la reacción sin aceptor. Este comportamiento también es diferente al presentado por la enzima de la cepa B512.

La síntesis de oligosacáridos de bajo peso molecular se puede llevar a cabo utilizando a la maltosa como aceptor. Para obtener una mezcla de azúcares con un alto índice de dispersión se debe partir de aceptores de mayor peso molecular como la panosa.

Los fenómenos anteriores fueron observados en velocidades iniciales y constituyen bases para definir estrategias para el desarrollo de un proceso de producción.

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

## VII BIBLIOGRAFIA

Alsop, R. (1983). Industrial production of dextrans. En: Process in industrial microbiology. Vol. 18. pp.1-43. ed. Buschel, M.E. Elsevier Scientific Publishing Co. Amsterdam.

Belder, A.N. (1990). General applications of dextran and its derivatives. En: Dextran, 2a. ed. Pharmacia LEO Therapeutics, Uppsala, Sweden. 62-79.

Böker, M., Jordering, H. & Buchholz, K. (1993). Kinetics of leucrose from sucrose by dextransucrase. Biotechnol. Bioeng. 43:856-864.

Bourne, E., Sidebotham, R., Wiegel, H. (1972). Studies on dextrans and dextranases. Part X. Types and percentages of secondary linkages in the dextrans elaborated by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B1299. Carbohydr. Res. 22:13-22.

Bourne, E., Sidebotham, R. & Weigel H. (1974). Studies on dextrans and dextranases. Part XI. The structure of a dextran elaborated by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B1299. Carbohydr. Res. 34:279-288.

Castillo, E. Iturbide, F., López-Munguía, A. Pelenc, V., Paul F. & Monsan, P. (1992). Dextran and oligosaccharide production with glucosyltransferases from different strains of *Leuconostoc mesenteroides*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 613:717-722.

Dedonder, R., (1972). Role and mechanism of transglycosylation reactions in biochemistry of glycosidic linkages. Piras & Pontis, H.G. New York. 21-78.

Dongling, S. Robyt, J. (1993). Control of the synthesis of dextran and acceptor-products by *Leuconostoc mesenteroides* B-512FM dextransucrase. Carbohydr. Res. 248:339-348.

Ebert, K. & Shenk, G. (1968). Mechanism of biopolymer growth: The formation of dextran and levan. 30:179-221. Adv. Enzymol. 30:190-202.

Ferretti, J., Gilpin, M. & Russell, R. (1987). Nucleotide sequence of a glucosyltransferase gene from *Streptococcus sobrinus* MFe28. J. Bacteriol. 169:4271-4278.

Fu, D. & Robyt, J. (1988). Essential histidines residues in dextransucrase chemical modification by diethyl pyrocarbonate and dye photooxidation. Carbohydr. Res. 183:97-109.

Fu, D. & Robyt, J. (1990). A facile purification of *Leuconostoc mesenteroides* B-512FM dextransucrase. Prep. Biochem. 20:93-106.

Funane, K., Shiraiwi, M., Hashimoto, K., Ichishima & Kobayashi, M. (1993). An active-site peptide containing the second essential carboxyl group of

- dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides* by chemical modifications. *Biochem.* 32:13696-13702.
- Hehre, E. (1946). Studies on the enzymatic synthesis of dextran from sucrose. *J. Biol. Chem.* 163:221-233.
- Houck, C. & Pear, J. (1990). Fruit specific transcriptional factors. United States Patent 4,943,674.
- Kato, C., & Kuramitsu, H. (1990). Carboxyl-terminal deletion analysis of the *Streptococcus mutans* glucosyltransferase-I enzyme. *FEMS Microbiol. Lett.* 72: 299-302.
- Kim, D. & Robyt, F. (1994). Properties of *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMC constitutive dextranucrase. *Enzyme Microb. Technol.* 16:1011-1015.
- Kobayashi, M., Shishido, K., Kikuchi, T. & Matsuda, K. (1973a). Methylation analysis of fractions from the *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B1299 dextran. *Agr. Biol. Chem.* 37:2763-2769.
- Kobayashi, M., Shishido, M., Kikuchi, T. & Matsuda, K. (1973b). Fractionation of the *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B1299 dextran and preliminary characterization of the fractions. *Agr. Biol. Chem.* 37:357-365.
- Kobayashi, M. & Matsuda, K. (1974). The dextranucrase isoenzymes of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299. *Biochim. Biophys. Acta.* 370:441-449.
- Kobayashi, M. & Matsuda, K. (1975a). Purification and characterization of two activities of the intracellular dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299. *Biochim. Biophys. Acta.* 397:69-79.
- Kobayashi, M. & Matsuda K. (1975b). Conversion of the extracellular dextranucrase isoenzymes from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299. *Agr. Biol. Chem.* 39:2087-2088.
- Kobayashi, M. & Matsuda K. (1976). Purification and properties of extracellular dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299. *J. Biochem.* 79:1301-1308.
- Kobayashi, M. & Matsuda, K. (1977). Structural characteristics of dextrans synthesized by dextransucrases from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299. *Agr. Biol. Chem.* 41:1931-1937.
- Kobayashi, M. & Matsuda, K. (1978). Inhibition of dextran synthesis by glucoamylase and endodextranase. *Carbohydr. Res.* 66:277-288.

- Kobayashi, M. & Matsuda, K. (1980). Characterization of the multiple forms and main component of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *Biochim. Biophys. Acta.* 614:46-62.
- Kobayashi, M. & Yokoyama I. (1984). Activation of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* by the substrate, dextran. *Agric. Biol. Chem.* 1:221-223.
- Kobayashi, M., Yokoyama, .I. & Matsuda, K. (1985). Effectors differently modulating the dextransucrase activity of *Leuconostoc mesenteroides*. *Agric. Biol. Chem.* 49: 3189-3195.
- Kobayashi, M. & Matsuda, K. (1986a). Electrophoretic analysis of the multiple forms of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Biochem.* 100:615-621.
- Kobayashi, M., Yokoyama, I. & Matsuda, K. (1986b). Substrate binding sites of *Leuconostoc* dextransucrase evaluated by inhibition kinetics. *Agric. Biol Chem.* 50:2585-2590.
- Kobayashi, S., Koga, k., Hayashida, O., Kakano, Y. & Hasegawa, Y. (1989), Glucan-binding domain of glucosyltransferase from *Streptococcus sobrinus*: Isolation of a 55-kilodalton peptide from a glucosyltransferase prebound to insoluble glucan. *Infect. Immun.* 57:2210-2213.
- Koepsell, H., Tsuchiya, H., Hellman, N., Kazenko, A., Hoffman, C., Sharpe, E. & Jackson, R. (1953). Enzymatic synthesis of dextran. *J. Biol. Chem.* 200:793-801.
- Kok, J. (1990). Genetics of the proteolytic system of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 87:15-42.
- Lis, M., Shiroza, T. & Kuramitsu, K. (1995). Role of the C-terminal direct repeating units of the *Streptococcus mutans* glucosyltransferase-S in glucan binding. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:2040-2042.
- López, A. Monsan, P. (1980). Dextran synthesis by immobilized dextransucrase. *Biochimie.* 62:323-329.
- Miller, A., Eklund, S. & Robyt, J. (1986). Milligram to grade scale purification and characterization of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F. *Carbohydr. Res.* 147:119-133.
- Monsan, P. & Paul, F. (1995). Enzymatic synthesis of oligosaccharides. *FEMS Microbiol. Rev.* 16:187-192.
- Monsan, P. (1995). Comunicación personal.

- Mooser, G., Shur, D., Lyou, M. & Watanabe, C. (1985). Kinetic studies on dextranucrase from the cariogenic oral bacterium *Streptococcus mutans*. J. Biol. Chem. 260:6907-6915.
- Mooser, G. & Wong, C. (1988). Isolation of a glucan-binding domain of glucosyltransferase (1,6- $\alpha$ -glucan synthase) from *Streptococcus sobrinus*. Infect. Immun. 56:880-884.
- Mooser, G. & Iwaoka, R. (1989). Sucrose 6- $\alpha$ -D-glucosyltransferase from *Streptococcus sobrinus*: Characterization of a glucosyl-enzyme complex. Biochim. 28:443-449.
- Mooser, G., Hefta, S., Paxton, R., Shively, J. & Lee, T. (1991). Isolation and sequence of an active peptide containing a catalytic aspartic acid from two *streptococcus sobrinus*  $\alpha$ -glucosyltransferases. J. Biol. Chem. 266:8916-8922.
- Nakano, Y. & Kuramitsu, H. (1992). Mechanism of *Streptococcus mutans* glucosyltransferases: hybrid-enzyme analysis. J. Bacteriol. 174:5639-5646.
- Oriol, E., Paul, F., Heyraud, A., Rianudo, M. & Monsan, P. (1987). Transfer reaction of glucosyl residues to maltose and purified oligosaccharides using highly active *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F dextranucrase. Enzyme Eng. 501:210-215.
- Paul, F., Oriol, E., Auriol, D. & Monsan, P. (1986). Acceptor reactions of a highly purified dextranucrase with maltose and oligosaccharides application to the synthesis of controlled-molecular weight dextrans. Carbohydr. Res. 149:433-441.
- Paul, F., López-Munguía, A., Remaud, M., Pelenc, V. & Monsan, P. (1988). Patente Francesa. 2 626,583.
- Reh, K., Jördening, H. Buchholz, K. (1990). Kinetics of oligosaccharide synthesis by dextranucrase. Enzyme Eng. 613:723-729.
- Remaud-Simeon, M., López-Munguía, A., Pelenc, V., Paul, F. & Monsan, P. (1994). Production and use of glucosyltransferases from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 for the synthesis of oligosaccharides containing  $\alpha$ -(1-2) linkages. Appl. Biochem. Biotech. 44:101-117.
- Robyt, J., Kimble, B. & Walseth, T. (1974). The mechanism of dextranucrase action ( The direction of dextran biosynthesis). Arch. Biochem. Biophys. 165:634-640.
- Robyt, J. & Taniguchi H. (1976). The mechanism of dextranucrase action. (Biosynthesis of branch linkages by acceptor reactions with dextran). Arch. Biochem. Biophys. 174:129-135.

Roby, J. & Walseth, T. (1978). The mechanism of acceptor reactions of *Leuconostoc mesenteroides* B-512F dextranase. Carbohydr. Res. 61:433-445.

Roby, J. (1979). Mechanism involved in the biosynthesis of polysaccharides. Trends Biochem Sci. 4:47-49.

Roby, J. & Eklund, S. (1983). Relative, quantitative effects of acceptor in the reaction of *Leuconostoc mesenteroides* B-512F dextranase. Carbohydr. Res. 121:279-286.

Roby, J. (1986). Dextran. En: Encyclopedia of Polymer Science and Engineering. Vol. 4 2a. ed. pp. 752-767. Eds Mak F., M. Bikales, G. Overberger & G. Menyes. John Wiley & Sons, Inc. N. York. E.U.A.

Roby, J. (1991). Reactions of glucanases in the biomass conversion of sucrose. En: Enzymes in biomass conversion. No. 460 ACS Symposium Series. pp. 394-406. Eds. G.F. Leatham & M.E. Himell. American Chemical Society. Washington D.C., E.U.A.

Seymour, f. Chen, E. & Bishop. S. (1979a). Methylation structural analysis of unusual dextrans by combined gas-liquid chromatography-mass spectrometry. Carbohydr. Res. 68:113-121.

Seymour, F. Knapp, R. Chen, E. Jeanes, A. & Bishop. S. H. (1979b). Structural analysis of dextrans containing 2-O- $\alpha$ -D-glycosylated  $\alpha$ -D-glucopyranosyl residues at the branch points, by use of  $^{13}$ C-nuclear magnetic resonance spectroscopy and gas-liquid chromatography-mass spectrometry. Carbohydr. Res. 71:231-250.

Shimamura, A., Nakano, Y., Mukasa, H. & Kuramitsu, H. (1994). Identification of amino acid residues in *Streptococcus mutans* glucosyltransferases influencing the structure of the glucan product. J. Bacteriol. 58:4845-4850.

Simpson, C., Giffard, P. & Jaques, N. (1995). *Streptococcus salivarius* ATCC 25975 possesses at least two genes coding for primer-independent glucosyltransferases. Infect. Immun. 63:609-621.

Stodola, F., Sharpe, E. & Koepsell, H.J. (1956). The preparation properties and structure of the disaccharide leucrose. J. Am. Chem. Soc. 78:2514-2518.

Stringer, C. & Tsuchiya, H. (1958). A kinetic study of dextranase. J. Am. Chem. Soc. 80:6620-6625.

Sumner, J. & Howell, S. (1935). A method for determination of saccharase activity. J. Biol. Chem. 108:51-54.

Tanriseven, A. & Robyt, J. (1992). Inhibition of dextran synthesis by acceptor reactions of dextransucrase, and the demonstration of separate acceptor binding site. *Carbohydr. Res.* 225:321-329.

Tanriseven, A., Robyt J. (1993). Interpretation of dextransucrase inhibition at high sucrose concentrations. *Carbohydr. Res.* 245:97-104.

Tomamatsu, H., (1994). Health effects of oligosaccharides. *Food Technol.* 48:61-65.

Valette, P., Pelenc, V., Djouzi, Z., Andrieux, C., Paul, F., Monsan, P. & Szylit, O. (1993). Bioavailability of new synthesised glucooligosaccharides in the intestinal tract of gnotobiotic rats. *J. Sci. Food Agric.* 62:121-127.

Wong, C., Hefta, S., Paxton, R. Shively, J. & Mooser, G. (1990). Size and subdomain architecture of the glucan-binding domain of sucrose: 3- $\alpha$ -D-glucosyltransferase from *Streptococcus sobrinus*. *Infect. Immun.* 58:2165-2170.